



Charakterisierung und Proteinengineering von P450-Monooxygenasen der CYP154-Familie für die Biokatalyse

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ansgar Rühlmann

aus Haselünne

Düsseldorf, April 2017

aus dem Institut für Biochemie, Lehrstuhl II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. Vlada B. Urlacher
Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zu Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 24. April 2017

Ansgar Rühlmann

Danksagung

Im Rahmen meiner Promotion durfte ich umfangreiche Unterstützung und einen aufregenden wissenschaftlichen Informationsaustausch erfahren. Aus diesem Grunde möchte ich mich an dieser Stelle bedanken:

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Vlada B. Urlacher für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, die Übernahme des Erstgutachtens zur Dissertation sowie für die Betreuung und für das mir entgegengebrachte Vertrauen während der Promotion.

Prof. Dr. Georg Groth danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Marco Girhard und Dr. Patrick Bakkes möchte ich für ihre ständige Ansprechbarkeit bei wissenschaftlichen Fragestellungen und ihren hilfreichen Korrekturvorschlägen zu meiner Dissertation danken.

Dr. Priska Le-Huu und meinen Brüdern Berthold und Robert möchte ich für das Korrekturlesen meiner Dissertation danken.

Bei allen weiteren Kollegen des Instituts für Biochemie II möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen, aber auch für die fruchtbaren unwissenschaftlichen Diskussionen danken.

Bei meinem Stipendienprogramm iGRASP_{seed} möchte ich mich nicht nur für die finanzielle Unterstützung, sondern auch für das gebildete Netzwerk und die dadurch erhaltenen themenübergreifenden Anregungen bedanken. Diese waren für mein Projekt sehr hilfreich.

Des Weiteren möchte mich bei Dr. Astrid Höppner und Stefanie Kobus der Crystal and X-Ray Facility, HHU Düsseldorf für ihre ausdauernde Hilfe bei der Lösung der Kristallstruktur von CYP154F1 bedanken.

Besonders möchte ich meiner Freundin Katharina danken, die mir auch in schwierigen Zeiten zur Seite stand.

Ein sehr herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mich während des Studiums, der Promotion und in allen anderen Belangen des Lebens unterstützt haben.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Originalartikel

Teile dieser Dissertation, die bereits veröffentlicht wurden:

Rühlmann, A., Antovic D., Müller T. J. J., & Urlacher, V. B. Regioselective hydroxylation of stilbenes by engineered cytochrome P450 from *Thermobifida fusca* YX. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, 359, 984-994.

Der eigene Beitrag des Originalartikels beinhaltetete alle experimentellen Arbeiten sowie das Schreiben des Manuskripts. Die chemische Synthese der verwendeten Substrate wurde in Kooperation mit Dragutin Antovic durchgeführt.

Teile dieses Originalartikels wurden in die vorliegende Dissertation übernommen (Kapitel 2.4 und 3.2). Abgedruckt mit Genehmigung. Copyright 2017 John Wiley and Sons.

Teile dieser Dissertation, die veröffentlicht werden sollen:

Rühlmann, A. & Urlacher, V. B. Functional characterization of CYP154F1 from *Thermobifida fusca* YX. In Vorbereitung.

Das Manuskript basiert auf den Inhalten aus Kapitel 2.1-2.3 und 3.1.

Weitere Veröffentlichungen, die nicht in dieser Arbeit enthalten sind:

Bakkes, P. J., Riehm, J. L., Sagadin, T., Rühlmann, A., Schubert, P., Biemann, S., Girhard, M., Hutter M., Bernhardt, R. & Urlacher, V. B. Engineering of versatile redox partner fusions that support monooxygenase activity of functionally diverse cytochrome P450s *Scientific reports* **2017**, in press

Müller, C.H., Wilking, M., Rühlmann, A., Wibbeling, B. & Hennecke, U. Catalytic, asymmetric, bromine-induced semipinacol rearrangements at unactivated double bonds. *Synlett* **2011**, 14, 2043-2047

Vorträge

Rühlmann, A. & Urlacher, V. B. Structural basis of substrate recognition by cytochrome P450 monooxygenases. *Annual Retreat iGRASP_{seed}* 18.-20. Februar (2015), Radevormwald, Deutschland.

Rühlmann, A. & Urlacher, V. B. Investigation of cytochrome P450 enzymes from *Thermobifida fusca*. *iGRASP_{seed} Protein Science School*, 26. Juni (2014), Düsseldorf, Deutschland.

Rühlmann, A. & Urlacher, V. B. Structural basis of substrate recognition by cytochrome P450 monooxygenases. *Annual Retreat iGRASP_{seed}* 17.-19. Februar (2014), Radevormwald, Deutschland.

Rühlmann, A. & Urlacher, V. B. Structural basis of substrate recognition by cytochrome P450 monooxygenases. *Annual Retreat iGRASP_{seed}* 7.-9. Januar (2013), Mülheim an der Ruhr, Deutschland.

Rühlmann, A. Urlacher, V. B. Structural basis of substrate recognition by cytochrome P450 monooxygenases. *iGRASP_{seed} Protein Science School*, 28. Mai (2013), Düsseldorf, Deutschland.

Poster

Rühlmann, A., von Bühler, C.J., Urlacher, V. B. Comparative analysis of three novel P450 monooxygenases from the CYP154 family. *Biotransformation 2014 Summer School*. Bad Herrenalb, Deutschland, 24.-27. August (2014).

Rühlmann, A., von Bühler, C.J., Urlacher, V. B. Comparative analysis of three novel P450 monooxygenases from the CYP154 family. *BIOTRANS 2015*. Wien, Österreich, 26.-30. Juli (2015).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	X
Abstract.....	XII
1 Einleitung	14
1.1 Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	14
1.1.1 Allgemeine Informationen.....	14
1.1.2 Redoxsysteme der Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	14
1.1.3 Katalytischer Mechanismus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	16
1.1.4 Nomenklatur und Struktur der Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	18
1.1.5 Anwendung in der Biokatalyse.....	19
1.1.6 Funktionelle Entschlüsselung unbekannter Cytochrom-P450-Monooxygenasen	21
1.1.7 Die CYP154-Familie	22
1.2 Stilbenoide.....	24
1.2.1 Vorkommen und biologische Aktivität.....	24
1.2.2 Biosynthese von Stilbenoiden.....	25
1.2.3 Darstellung von Stilbenoiden	26
1.3 Ziel der Arbeit	29
2 Ergebnisse	30
2.1 Deorphanisierung von CYP154F1.....	30
2.1.1 Klonierung und Expression von unterschiedlich annotierten CYP154F1-Versionen ..	30
2.1.2 Identifikation von heterologen Redoxpartner-Proteinen	33
2.1.3 Identifikation des Substratspektrums von CYP154F1	35
2.2 Kristallisation von CYP154F1	37
2.2.1 Das initiale Screening von Bedingungen zur Proteinkristallisation	37
2.2.2 <i>Fine screening</i> der Kristallisationsbedingungen.....	38
2.2.3 3D-Struktur von CYP154F1	39
2.3 Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung.....	42
2.3.1 Identifikation von Schlüsselpositionen (<i>key residues</i>) von CYP154F1	42
2.3.2 Mutagenese an der Position T234 von CYP154F1.....	45
2.3.3 Kinetische Parameter und Kopplungseffizienz von der Umsetzung von Geraniol	46
2.4 Regioselektive Hydroxylierung von (<i>E</i>)-Stilben und dessen Derivaten.....	48
2.4.1 Screening von CYP154-Enzymen für die Oxidation von Stilbenen.....	48
2.4.2 Konstruktion von CYP154E1-basierten Mutanten.....	48
2.4.3 Aktivität der CYP154E1-Varianten gegenüber (<i>E</i>)-Stilben.	49
2.4.4 Generierung von CYP154E1-Mehrfachmutanten	51

2.4.5	Aktivität der Mutanten gegenüber (<i>E</i>)-2-Hydroxystilben (1b), (<i>E</i>)-3-Hydroxystilben (1c) und Pinosylvin (1d)	53
2.4.6	Umsetzungen bei höheren Substratkonzentrationen.....	54
2.4.7	Umsetzung von Stilbenen in Anwesenheit von Methyl- β -Cyclodextrin.....	55
2.4.8	Identifikation der Oxidationsprodukte.....	57
3	Diskussion.....	60
3.1	Deorphanisierung von CYP154F1 und Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung...60	
3.1.1	Klonierung und Expression von CYP154F1	60
3.1.2	Kristallisation von CYP154F1	61
3.1.3	Cluster-Screening und Vergleich der Substratspektren von CYP154F1 und CYP154E1	64
3.1.4	Mutagenese-Studien zu CYP154F1.....	66
3.1.5	Mutagenese-Studien an der Position T234	67
3.2	Regioselektive Hydroxylierung von (<i>E</i>)-Stilben und dessen Derivaten.....	70
3.2.1	Optimierung von CYP154E1 durch ortsspezifische Mutagenese	70
3.2.2	Regioselektivität der Stilbenhydroxylierung	73
3.2.3	Optimierung der Umsetzungen durch Zugabe von Methyl- β -Cyclodextrin.....	73
3.2.4	Biologische Aktivität der hergestellten Stilbenoide	74
4	Schlussfolgerung und Ausblick	76
5	Material und Methoden	78
5.1	Materialien.....	78
5.1.1	Chemikalien, Enzyme, Puffer.....	78
5.1.2	Plasmide, Stämme, Oligonukleotide.....	82
5.2	Molekular- und mikrobiologische Methoden	85
5.2.1	Agarosegelelektrophorese und Bestimmung der DNA-Konzentration	85
5.2.2	Gelextraktion und Aufreinigung der DNA-Fragmente.....	85
5.2.3	Enzymatischer Verdau und Ligation von DNA-Fragmenten	85
5.2.4	Konstruktion des rekombinanten Plasmids pET-28a(+)_CYP154F1	85
5.2.5	Ortsspezifische Mutagenese	86
5.2.6	Anzucht der <i>E. coli</i> -Zellen.....	87
5.2.7	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	87
5.2.8	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	87
5.2.9	Isolierung von Plasmid-DNA	88
5.2.10	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	88
5.2.11	Zellernte und Zellaufschluss	88
5.3	Biochemische Methoden	88
5.3.1	Reinigung der Proteine	88
5.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	89
5.3.3	Verdau des His-getaggten CYP154F1 (His-tfu_1748) mit Thrombin.....	89

5.3.4	Kristallisation von CYP154F1	89
5.3.5	Bestimmung der P450-Konzentration.....	90
5.3.6	Bestimmung der volumetrischen GDH-Aktivität	91
5.3.7	Bestimmung der kinetischen Parameter.....	91
5.3.8	Bestimmung der Kopplungseffizienz	92
5.3.9	Screening der Substratbibliothek.....	92
5.3.10	Reaktionen im analytischen Maßstab	93
5.3.11	Reaktionen im präparativen Maßstab	93
5.3.12	Synthese der Stilbenoide (in Kooperation mit Dragutin Antovic).....	94
5.4	Analytische Methoden.....	96
5.4.1	GC/MS-Analyse	96
5.4.2	LC/MS-Analyse.....	96
5.4.3	NMR-Spektroskopie	97
6	Literaturverzeichnis	98
7	Anhang	115
7.1	Abkürzungen	115
7.2	Substratbibliothek und Formelregister	117
7.2.1	Substratbibliothek für das Cluster-Screening	117
7.2.2	Formelregister für das Cluster-Screening	119
7.2.3	Formelregister der Stilbene.....	124
7.3	MS-Spektren.....	125
7.3.1	MS-Spektren von Geraniol und (<i>E</i>)-8-Hydroxygeraniol	125
7.3.2	MS-Spektren der Stilbene.....	125
7.4	NMR-Spektren	128
7.4.1	(<i>E</i>)-2-Hydroxystilben (1b).....	128
7.4.2	(<i>E</i>)-3-Hydroxystilben (1c)	130
7.4.3	(<i>E</i>)-4,4'-Diacetoxystilben	132
7.4.4	(<i>E</i>)-4,4'-Dihydroxystilben (4a).....	134
7.4.5	(<i>E</i>)-2,4'-Dihydroxystilben (2b)	136
7.4.6	(<i>E</i>)-2,4',5-Trihydroxystilben (4b).....	138
7.4.7	(<i>E</i>)-3,4'-Dihydroxystilben (2c).....	140
7.4.8	Resveratrol (2d).....	142
7.5	Proteinsequenzen und Proteinsequenzalignment.....	144
7.5.1	Proteinsequenzen der verschiedenen CYP154F1-Versionen.....	144

Zusammenfassung

Die charakterisierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP oder P450) der Familie 154 zeichnen sich durch ihr breites Substratspektrum und ihre hohe Aktivität aus. Daher stellen die noch nicht charakterisierten P450 dieser Familie einen wichtigen Genpool für Enzyme mit biokatalytischem und biotechnologischem Potential dar, weshalb deren Charakterisierung von großem Interesse ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde CYP154F1 aus *Thermobifida fusca* YX kloniert, exprimiert in *E. coli* und charakterisiert. Hierzu wurde das Substratspektrum von CYP154F1 untersucht und mit dem verwandten CYP154E1 (Aminosäuresequenz-Identität von 50 %) aus dem gleichen Bakterium verglichen. Es wurde eine Bibliothek von über 100 organischen Verbindungen in *in-vitro*-Reaktionen mit CYP154F1 getestet. Im Gegensatz zu CYP154E1 erwies sich CYP154F1 als deutlich weniger aktiv und promiskuitiv bezüglich der getesteten Verbindungen. CYP154F1 akzeptierte als Substrate hauptsächlich kleine azyklische organische Verbindungen mit einer Kettenlänge von C₈-C₁₀, während CYP154E1 auch größere Substrate wie die Stilbene oder das Sesquiterpenoid (+)-Nootkaton akzeptierte.

Um auf molekularer Ebene Determinanten zu lokalisieren, die für die unterschiedlichen Substratspektren verantwortlich sind, wurden Homologiemodelle von CYP154F1 und CYP154E1 erstellt. Für die Identifikation der Positionen, welche für die verschiedenen Eigenschaften verantwortlich sind, wurde durch Mutagenese die Substratbindetasche von CYP154F1 sukzessiv an die von CYP154E1 angeglichen. Anschließend wurden die erstellten CYP154-Varianten an einer Auswahl von potentiellen Substraten getestet. Mit dieser Methode konnte die polare Aminosäure Threonin an der Position 234 (Thr234) identifiziert werden, die maßgeblich für das enge Substratspektrum und die niedrige Aktivität von CYP154F1 verantwortlich ist. Durch einen Austausch von Thr234 mit einer hydrophoben Aminosäure konnte das Substratspektrum erweitert und die Aktivität gesteigert werden.

In parallel durchgeführten Experimenten konnte mittels Röntgenkristallographie die 3D-Struktur von CYP154F1 erfolgreich aufgeklärt werden. Die Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur ermöglichte tiefere Einblicke in die Struktur-Funktions-Beziehung von CYP154F1 und trugen zur Erklärung der erhaltenen Ergebnisse bei. So konnte gezeigt werden, dass die Orientierung der Hydroxygruppe des Thr234 der Bindetasche deutlichen polaren Charakter verleiht. Durch den Austausch des Thr234 durch die kleineren hydrophoben Aminosäuren Alanin und Valin wurde nicht nur die Polarität in der Bindetasche geändert, sondern auch ihre Größe. Die entsprechenden Mutanten konnten die Oxidation der größeren, von CYP154E1 akzeptierten Substrate, wie (*E*)-Stilben und (+)-Nootkaton, katalysieren. Hingegen führte der Austausch mit den größeren hydrophoben Aminosäuren Leucin und Methionin zu einer 18- bzw. 25-fachen Steigerung des Umsatzes des kleineren Substrats Geraniol.

In einer weiteren Studie konnten die Vorteile von CYP154E1 gegenüber CYP154F1 in der Umsetzung des biotechnologisch interessanten Substrats (*E*)-Stilben gezeigt werden. CYP154E1 hydroxylierte (*E*)-Stilben mit 100 %iger Regioselektivität zu (*E*)-4,4-Dihydroxystilben. Weitere

Untersuchungen zeigten, dass CYP154E1 in der Lage ist, nicht nur die aromatische Hydroxylierung von (*E*)-Stilben, sondern auch von weiteren Stilbenderivaten zu katalysieren, welches eine chemisch anspruchsvolle Reaktion darstellt.

Die Produkte dieser Reaktionen gehören zu den Naturstoffen der Stilbenoide, welche für ihre vielfältigen biologischen Aktivitäten bekannt sind. Für die Optimierung der enzymatischen Synthese dieser interessanten Verbindungen wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurde durch semirationales Proteindesign die Aktivität des Biokatalysators gesteigert, zum anderen wurden durch die Zugabe eines Cyclodextrins die Reaktionsbedingungen optimiert. Mit diesen Optimierungen konnten z. B. von (*E*)-3-Hydroxystilben Konzentrationen von bis zu 20 mM umgesetzt und TTN-Werte (*total turnover number*) von bis zu 20.000 erreicht werden. Die erzielten Produkttiter von bis zu 4,2 g/l lagen dabei deutlich höher als die der literaturbekannten mikrobiellen Synthesen von Stilbenoiden. Insgesamt konnte so ein biokatalytischer Prozess für die Synthese der fünf Stilbenoide (*E*)-2,4'-Dihydroxystilben, (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben, Resveratrol, (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben und (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben entwickelt werden.

Abstract

The characterized members of the cytochrome P450 monooxygenase (CYP or P450) family 154 are well-known for their broad substrate spectrum and their high activity. Hence, the as yet uncharacterized CYP154 members constitute an important pool for enzymes with biocatalytic and biotechnological potential, and therefore their characterization is of great interest.

In this study, CYP154F1 from *Thermobifida fusca* YX was cloned, expressed in *E. coli* and characterized. Herein the substrate spectrum of CYP154F1 was investigated and compared to that of the related CYP154E1 (amino acid identity of 50%) from the same bacterium. For this purpose, a library of more than 100 organic compounds was screened as possible substrates for CYP154F1. In contrast to CYP154E1, CYP154F1 proved to be much less promiscuous and less active. CYP154F1 accepted mainly small acyclic organic compounds with a chain length of C₈-C₁₀, whereas CYP154E1 also accepted large substrates, such as stilbenes or sesquiterpenoids like (+)-nootkatone.

To locate molecular determinants, that are responsible for the differences in their substrate spectra, homology models of CYP154E1 and CYP154F1 were built. A comparison of these models revealed differences in the amino acid composition of the substrate binding pocket. In order to identify which positions are responsible for the different properties, the substrate binding pocket of CYP154F1 was gradually modified by mutagenesis to mimic that of CYP154E1. The obtained CYP154F1 variants were tested for activity using a selection of potential substrates. This procedure enabled the identification of the polar amino acid threonine at position 234 (Thr234) that largely contributes to the narrow range of substrates as well as the low monooxygenase activity of CYP154F1. Substitution of Thr234 with a hydrophobic amino acid led to a broader substrate spectrum and a higher activity. In parallel experiments, the 3D structure of CYP154F1 was successfully determined by x-ray crystallography. In addition, the crystal structure and the mutagenesis studies provided more insight into the structure-function relationship of CYP154F1. It could be shown that the orientation of the hydroxy group of Thr234 is responsible for the remarkable polar character of the substrate binding pocket.

Substitution of Thr234 with the small, hydrophobic amino acids alanine or valine increased the hydrophobicity and size of the binding pocket. Thus, the corresponding mutants were able to convert larger substrates like (*E*)-stilbene and (+)-nootkatone, which are also substrates of CYP154E1. Substitution with the larger hydrophobic leucine or methionine led to an 18- or 25-fold increase, respectively, in the conversion of the smaller substrate geraniol.

In a comparative study, CYP154E1 proved superior to CYP154F1 in converting the biotechnologically interesting substrate (*E*)-stilbene. CYP154E1 was able to hydroxylate (*E*)-stilbene to (*E*)-4,4-dihydroxystilbene with 100% regioselectivity. Moreover, CYP154E1 catalyzed not only aromatic hydroxylation of (*E*)-stilbene, but also of stilbene derivatives, which is a challenging task in chemical synthesis. The products of these reactions belong to the class of stilbenoids, which are known for their various biological activities.

To improve the activity of CYP154E1, two different approaches were followed. On the one hand, the activity of the biocatalyst was increased by protein engineering. On the other hand, the reaction

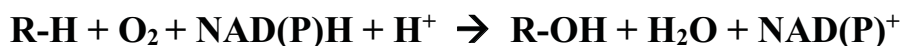
conditions were improved by the addition of a cyclodextrin. With these improvements, up to 20 mM of (*E*)-3-hydroxystilbene were converted and total turnover numbers of up to 20,000 were obtained. Product titers of more than 4.2 g/l were achieved, which are higher than that of previously described microbial synthesis of stilbenoids. In total, a biocatalytic process for the synthesis of the five stilbenoids (*E*)-2,4'-dihydroxystilbene, (*E*)-3,4'-dihydroxystilbene, resveratrol, (*E*)-4,4'-dihydroxystilbene und (*E*)-2,4',5-trihydroxystilbene were developed.

1 Einleitung

1.1 Cytochrom-P450-Monooxygenasen

1.1.1 Allgemeine Informationen

Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYPs oder P450s) sind Enzyme aus der Klasse der Oxidoreduktasen (EC 1.14.-.-). Sie kommen in Eukaryoten, Pilzen, Archaea, Bakterien und sogar in Viren vor.^[1] In Wirtsorganismen sind P450-Enzyme für die Metabolisierung von Xenobiotika oder für die Synthese von Sekundärmetaboliten zuständig.^[2] Über 52.000 P450-Sequenzen wurden bereits klassifiziert.^[3] P450-Enzyme beinhalten Häm b als prosthetische Gruppe. Bei der Koordination von Kohlenstoffmonoxid am reduzierten Hämeisen zeigen P450-Enzyme ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei ungefähr 450 nm, woher der Name P450 abgeleitet ist (P = Pigment).^[4,5] Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysieren die Oxidation von Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatomen mit Hilfe des molekularen Sauerstoffs. Für die katalysierten Reaktionen sind Reduktionsäquivalente notwendig, die von den Koenzymen NADH oder NADPH stammen. Diese werden für die Aktivierung und Spaltung des molekularen Sauerstoffs benötigt. Zu den geläufigsten Reaktionen zählen die (aromatische) Hydroxylierung von C-H Bindungen (Schema 1) oder Epoxidierung von C-C Doppelbindungen. Je nach chemischer Umgebung des oxidierten Atoms kann es anschließend zu einer Weiterreaktion kommen, wie z. B. zu einer C-C-Bindungsspaltung, einer Desaminierung oder einer *N*-, *O*-, *S*-Dealkylierung. Weiterhin sind P450 in der Lage, Heteroatome zu oxidieren und eine Vielzahl weiterer Reaktionen zu katalysieren.^[6] Zudem wurden unnatürliche Reaktionen wie Cyclopropanierung und intramolekulare C-H-Aminierung beschrieben.^[7,8]



Schema 1. Allgemeine Reaktionsgleichung einer Hydroxylierungsreaktion katalysiert durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen

1.1.2 Redoxsysteme der Cytochrom-P450-Monooxygenasen

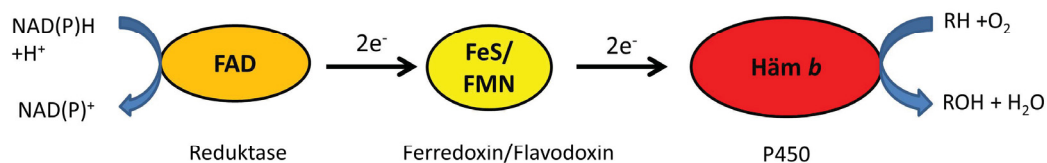
Wie bereits erwähnt, werden für die katalytische Aktivität der Cytochrom-P450-Monooxygenasen Elektronen von dem Koenzym NAD(P)H benötigt. NAD(P)H kann allerdings nur ein Hydrid, also zwei Elektronen, übertragen. Wie in Schema 1 zu sehen ist, benötigt die Cytochrom-P450-Monooxygenase im Verlauf des katalytischen Zyklus jedoch zwei einzelne Elektronen. Daher sind Redoxpartner-Proteine mit entsprechenden Kofaktoren notwendig, die in der Lage sind, zwei Elektronen von NAD(P)H aufzunehmen und einzeln an die P450-Monooxygenase abzugeben. Es sind verschiedene Redoxsysteme für diesen Zweck bekannt. Cytochrom-P450-Monooxygenasen werden entsprechend ihrer Redoxpartner in verschiedene Klassen eingeordnet. Hannemann *et al.* haben insgesamt zehn Klassen beschrieben, wobei die geläufigsten Klassen (I, II, III und VIII) hier näher beschrieben werden.^[9]

Zur Klasse I gehören P450-Enzyme, die mit einem Eisen-Schwefel-Cluster (FeS) enthaltenden Ferredoxin interagieren, welches Elektronen von einer FAD-haltigen Reduktase beziehen

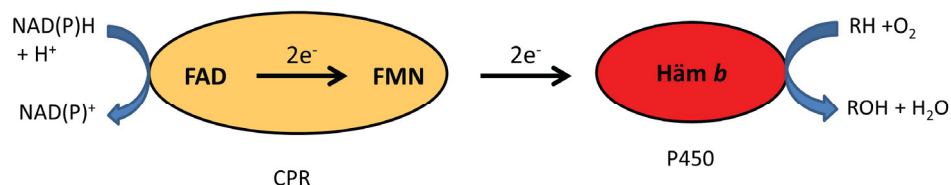
(Abbildung 1A). Dieses Redoxsystem ist häufig bei bakteriellen Cytochrom-P450-Monooxygenasen vorzufinden. Die beteiligten Komponenten sind in diesem System alle löslich. Ein Beispiel dieser Klasse ist P450cam (CYP101A1), Putidaredoxin (Pdx) und Putidaredoxin-Reduktase (PdxR) aus *Pseudomonas Putida*.^[10] Ein weiterer Vertreter dieser Klasse ist P450scc (CYP11A1) mit der Adrenodoxin-Reduktase (AdR) und Adrenodoxin (Adx).^[11] Sie sind in den Mitochondrien der Nebenniere von Wirbeltieren lokalisiert. In diesem Redoxsystem fungiert das lösliche Adx als Elektronen-Shuttle zwischen den membrangebundenen AdR und P450scc. Im Unterschied zur Klasse I beziehen P450-Enzyme der Klasse III die Elektronen von einem FMN-haltigen Flavodoxin (Abbildung 1A). Als Beispiel für solch ein Dreikomponentensystem, welches ein Flavodoxin enthält, ist hier die Cineol-Hydroxylase P450cin (CYP176A1) aus *Citrobacter braakii* zu nennen.^[12]

P450-Enzyme der Klasse II interagieren mit einer Cytochrom-P450-Reduktase (CPR), in der eine Flavodoxin (FAD)-Reduktase und das FMN-haltige Flavodoxin fusioniert sind (Abbildung 1B). Dieses Redoxsystem ist in eukaryotischen Organismen vorzufinden. Die CPR und die P450 sind membrangebunden und befinden sich wie z. B. die humane Aromatase (CYP19A1) im endoplasmatischen Retikulum (ER).

A: Klasse I und III



B: Klasse II



C: Klasse VIII

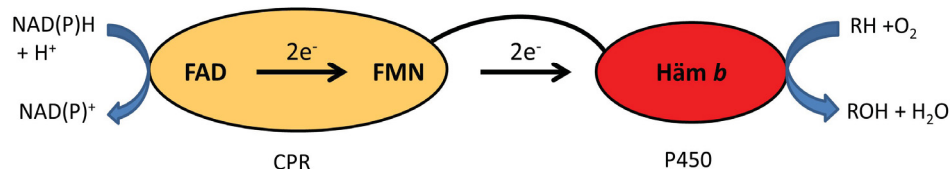
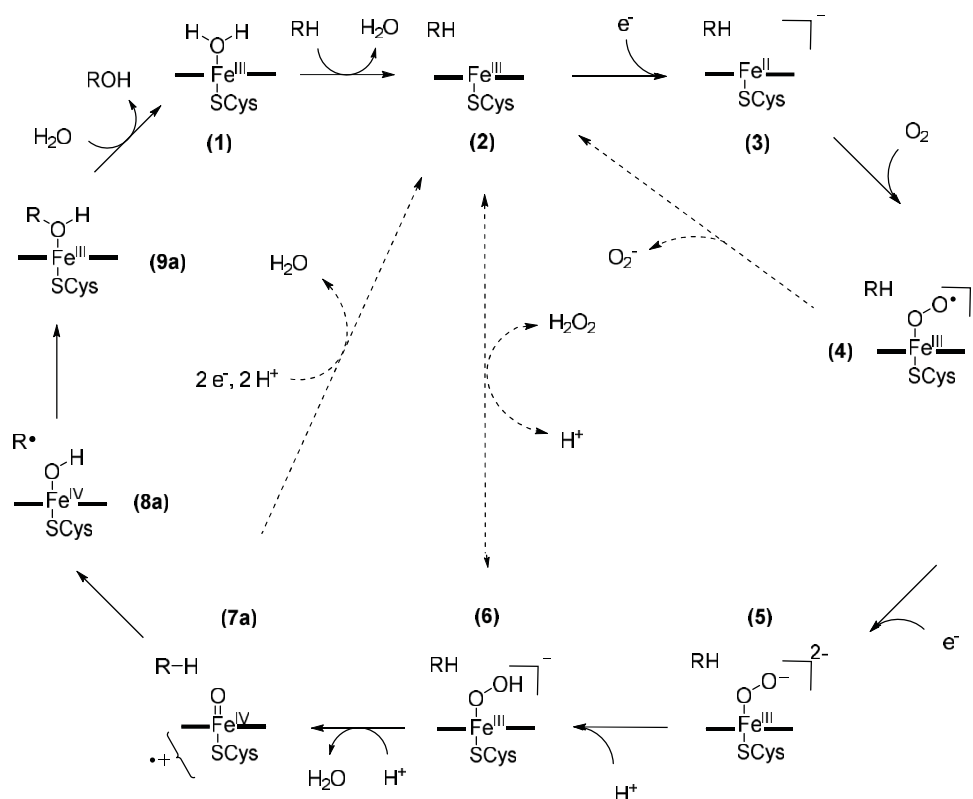


Abbildung 1. Ausgewählte Redoxsysteme der Cytochrom-450-Monooxygenasen. A) Klasse I und III: Redoxsystem bestehend aus einer Reduktase, einem Ferredoxin oder Flavodoxin und einer P450-Monooxygenase Komponenten. B) Klasse II: Redoxsystem bestehend aus einer CPR und einer P450-Monooxygenase. C) Klasse VII: Fusion von einer CPR und einer P450-Monooxygenase. FeS = Eisen-Schwefel-Cluster; CPR = Cytochrom-P450-Reduktase. RH = Substrat; ROH = hydroxyliertes Produkt. Geändert nach Hannemann.^[9]

In der Klasse VIII sind eine Cytochrom-P450-Monooxygenase und eine CPR in einem Protein fusioniert. Dieses aus einer Komponente bestehende System kommt deutlich seltener vor (Abbildung 1C). Ein bekannter Vertreter dieser Klasse ist P450-BM3 (CYP102A1) aus *Bacillus megaterium*.^[13,14]

1.1.3 Katalytischer Mechanismus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Zu Beginn des katalytischen Zyklus ist Wasser als sechster Ligand an das zentrale Eisenatom des Häms gebunden ((1), Schema 2). Durch Substratbindung in der Nähe der Häm-Gruppe wird durch strukturelle Änderungen die Bindung des axialen Wassers gestört bzw. dieser Ligand verdrängt (2). Mit der Verdrängung des relativ starken sechsten Liganden sinkt die Ligandenfeldaufspaltung unterhalb des Niveaus der Spinpaarungsenergie, was den (teilweisen) Übergang vom Eisen-II-Low-Spin-Komplex zum High-Spin-Komplex bewirkt.^[15,16] Mit der Änderung des Spin-Zustandes ändert sich auch das Redoxpotential und erleichtert dadurch die Übertragung des ersten Elektrons vom Elektrontransferpartner zum Eisen-II-High-Spin-Komplex (3).^[15] Im nächsten Schritt wird der Eisen-II-Komplex durch Bindung von molekularem Sauerstoff zu einem Eisen-III-Superoxo-Komplex ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{--O}_2^-$) (4) oxidiert. Dieser wird durch eine weitere Übertragung eines Elektrons zu dem Eisen-III-Peroxo-Komplex ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{--O}_2^{2-}$) reduziert (5). Die anschließende Protonierung führt zu dem Eisen-III-Hydroperoxo-Komplex, der auch *compound 0* genannt wird (6). Die anschließende Protonierung führt zu dem Eisen-III-Hydroperoxo-Komplex, der auch *compound 0* genannt wird (6).

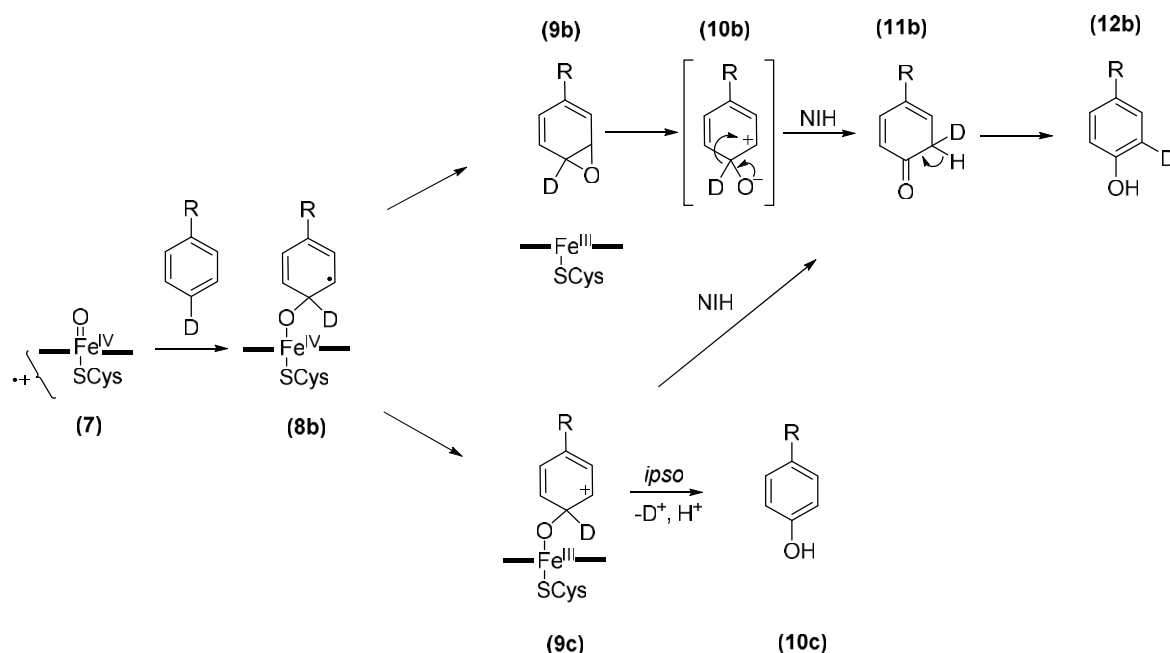


Schema 2. Katalytischer Zyklus von Cytochrom-P450-Monooxygenasen während einer Hydroxylierung. Die zwei fett gedruckten Linien am Eisen sind stellvertretend für den Porphyrinring eingezeichnet. In *compound 1* (7a) ist das Radikalkation über den Porphyrinring und dem Schwefelatom des Cysteinthiolat-Liganden vom Protein delokalisiert. Die Entkopplungsreaktionen (*shunt pathways*) sind in gestrichelten Linien dargestellt.

Durch eine weitere Protonierung und intramolekulare Übertragung zweier Elektronen wird die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung unter Wasserfreisetzung heterolytisch gespalten.^[17] Das Eisenatom und der *non-innocent*-Ligand Porphyrin werden dabei zu einem Eisen-IV-Oxo-Porphyrin-Radikalkation-Komplex oxidiert (**7a**).^[18]

Hierbei ist das Radikalkation über den Protoporphyrinring und dem Schwefelatom des Cysteinthiolat-Liganden vom Protein delokalisiert. Diese Spezies, auch *compound I* genannt, ist die eigentliche aktive Spezies, die in der Lage ist, selbst C-H Bindungen nicht aktivierter Kohlenwasserstoffe homolytisch zu spalten. Die Substrathydroxylierung verläuft über den sogenannten *rebound*-Mechanismus unter Retention der Konfiguration.^[19–21] Zunächst wird ein Wasserstoffradikal des Substrats durch *compound I* abstrahiert, was zur Bildung eines Eisen-IV-Hydroxid-Komplexes (*compound II*) (**8a**) führt. Die Oxidationsstufe des Eisens bleibt erhalten, da ein Elektron auf den Porphyrin-Radikalkation Liganden übertragen wird. *Compound II* reagiert daraufhin mit dem Substratradikal zu dem hydroxylierten Produkt und einem Eisen-III-Komplex (**9a**). Im letzten Schritt dissoziiert das hydroxylierte Produkt und ein Wassermolekül wird wieder als sechster Ligand koordiniert (**1**).

Im Fall der aromatischen Hydroxylierung ist die direkte Hydroxylierung energetisch unvorteilhaft, da die C-H Bindungsenergie in aromatischen Ringen (z. B. für Benzol $\text{C}_6\text{H}_5\text{-H} = 112 \text{ kcal mol}^{-1}$) deutlich höher liegt als die der Alkyl C-H Bindungen ($\sim 89\text{-}100 \text{ kcal mol}^{-1}$).^[22] Daher wird das π -System des Aromaten von *compound I* angegriffen und ähnelt eher dem Mechanismus der P450-katalysierten Epoxidierung (Schema 3). Es entsteht eine kovalente Bindung zwischen dem Eisen-IV-Oxo-Komplex und dem nun radikalischen Aromaten (**8b**).



Schema 3. Mechanismus der aromatischen Hydroxylierung. Die Reaktion mit NIH-*shift* kann über ein Epoxid (**9b**) oder einem Areniumion (**9c**) als Intermediat verlaufen. Ausgehend von dem Areniumion (**9c**) ist auch eine *ipso*-Substitution möglich. Zur Verdeutlichung der 1,2-Umlagerung (NIH-*shift*) wurde ein Deuterium (D) anstatt Wasserstoff (H) eingezeichnet.

Dieses Intermediat kann sich nun radikalisch zu einem Epoxid schließen (**9b**). Als nächstes kann sich eine der beiden C-O-Bindungen des Epoxids heterolytisch spalten, wobei sich ein resonanzstabilisiertes Kation bildet (**10b**).

Darauf folgt eine Ketonbildung und eine 1,2-Umlagerung eines Hydrides, dem sogenannten NIH-shift (**11b**) (Die Namensgebung beruht darauf, dass die ersten mechanistischen Studien hierzu am *National Institute of Health* durchgeführt wurden^[23]).

Durch die Enolisierung (**11b**) wird der aromatische Zustand wiederhergestellt und es entsteht das resultierende Phenol (**12b**). Die Bildung eines Epoxids wurde zum Beispiel in der P450-katalysierten Oxidation von Benzol direkt nachgewiesen, die Oxidation von Aromaten muss allerdings nicht zwangsweise über ein Epoxid verlaufen.^[24] Die radikalisch-tetraedrische Zwischenstufe (**8b**) kann alternativ, nach Elektronenumverteilung von der Arylgruppe zum Häm, zu einem Areniumion (**9c**) führen, welches sich dann entweder nach einem NIH-shift zum Keton (**11b**) oder direkt zum Phenol (**10c**) umlagern kann.^[25,26] Letzteres entspräche einer *ipso*-Substitution.

Neben dem Zyklus, der zur Produktbildung führt, bestehen auch sogenannte *shunt-pathways* oder Entkopplungsreaktionen.^[2] Hierbei bilden sich aus den Spezies (**4**), (**6**) und (**7**) Superoxid, Wasserstoffperoxid oder Wasser und wieder die Spezies (**2**).^[27,28] So ist der Verbrauch der Reduktionsäquivalente des NAD(P)Hs von der Produktbildung entkoppelt. Diese Nebenreaktionen entstehen meist (in unterschiedlicher Ausprägung) bei unnatürlichen Substraten, die nicht optimal in das aktive Zentrum passen.^[29]

1.1.4 Nomenklatur und Struktur der Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Cytochrom-P450-Monooxygenasen sind nach ihrer Aminosäuresequenz-Identität in Familien und Unterfamilien klassifiziert. P450-Enzyme derselben Familie besitzen eine Übereinstimmung der Proteinsequenz von über 40 %. Ist die Übereinstimmung größer als 55 % gehören sie auch derselben Unterfamilie an. Zum Beispiel steht in der Bezeichnung CYP3A4 die erste arabische Zahl für die Familie und der Buchstabe für die Unterfamilie. Die Zahl hinter dem Buchstaben wird fortlaufend für neu eingeordnete Proteine in dieser Unterfamilie verwendet.

Die Aminosäuresequenz-Identität zwischen zwei Familien kann dabei stark voneinander abweichen und liegt teilweise unter 15 %.^[30] Die Tertiärstruktur ist allerdings bei allen bis jetzt kristallisierten P450-Enzymen sehr ähnlich. Diese wird von mindestens zwölf α -Helices (A-L) und mindestens vier β -Faltblättern (β 1- β 4) gebildet (Abbildung 2).^[31] Je näher diese Sekundärstrukturen sich am Häm befinden, umso konservierter ist dessen Anordnung.^[32] Der einheitliche, Häm-bindende strukturelle Kern besteht aus den Helices D, E, I, L, J und K.^[33] Insgesamt sind nur drei Aminosäuren in allen Cytochrom-P450-Monooxygenasen streng konserviert. Darunter das Cystein, welches koordinativ als fünfter Ligand das Hämeisen bindet, sowie ein Glutamat und ein Arginin, die zusammen in dem Motiv ExxR vorkommen. Dieses Motiv liegt auf der K-Helix und stabilisiert über Salz- und Wasserstoffbrückenbindungen den sogenannten *meander-loop*, der wiederum für die Häm-Bindung und die Stabilisierung der Tertiärstruktur von Bedeutung ist.^[31]

Die Regionen, die für die Substraterkennung verantwortlich sind, sind sehr variabel. Gotoh *et al.* identifizierten insgesamt sechs dieser sogenannten *substrate recognition sites* (SRS).^[34] Die SRS1

liegt im sehr variablen Bereich der B-C Schleife. Die SRS2 und SRS3 liegen im Bereich der F-G-Schleife und formen einen Teil des Substrateingangskanals. Die SRS4 befindet sich inmitten der I-Helix im aktiven Zentrum. SRS5 liegt im β 1-4-Faltblatt und SRS6 in der Schleife am Ende des β 4-Faltblattes und ragen beide ins aktive Zentrum.^[35]

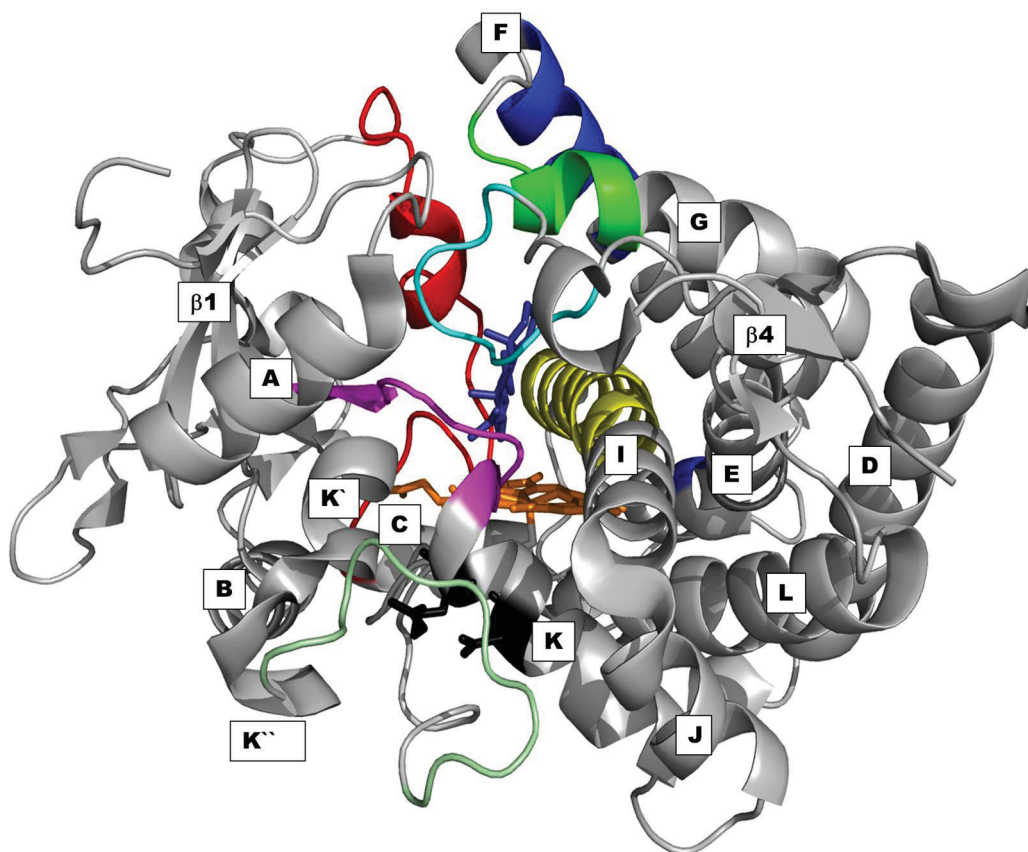


Abbildung 2. Struktur von CYP154C5 aus *Nocardia farcinica* im Komplex mit Progesteron (PDB-Code: 4J6C)^[36] aus den α -Helices A-L und den β -Faltblättern β 1–4. Das Glutamin und das Arginin aus dem ExxR-Motiv sind in Schwarz, der meander-loop in Blassgrün dargestellt. Das Häm ist in Orange gefärbt und der Ligand Progesteron violett. Die Bestimmung der *substrate recognition sites* (SRS) wurde durch einen Sequenzvergleich mit P450cam durchgeführt. Die *substrate recognition sites* sind wie folgt gefärbt: SRS1 = rot, SRS2 = grün, SRS3 = blau, SRS4 = gelb, SRS5 = pink, SRS6 = türkis.

1.1.5 Anwendung in der Biokatalyse

Cytochrom-P450-Monooxygenasen sind aufgrund ihrer hohen Substratvielfalt, der hohen Regio- und Stereoselektivität und ihrer Fähigkeit, chemisch anspruchsvolle Reaktionen zu bewerkstelligen ausgiebig auf ihr Potential als Biokatalysatoren untersucht worden.^[2,37–40] Aufgrund dieser Eigenschaften besteht ein fortwährendes Interesse für die Erforschung neuer P450-katalysierter Reaktionen von unbekannten oder bereits bekannten P450.

Cytochrom-P450-Monooxygenasen werden zum Beispiel für die Synthese von Metaboliten von Arzneimittel verwendet. Ungefähr 60 % aller Arzneimittel werden im menschlichen Körper mit Hilfe von P450-Enzymen metabolisiert.^[41] Die Synthese von Metaboliten ist für die toxikologischen

Untersuchungen notwendig.^[41–43] Hierzu werden oft Mikrosomen-Präparationen oder heterolog exprimierte humane P450-Enzyme verwendet.^[44] Aufgrund der schwierigen Expression von Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus Säugetieren geraten die löslichen, bakteriellen P450-Enzyme immer mehr in den Fokus zur Metabolitsynthese.^[42,45,46]

Für die Biosynthese von Feinchemikalien und Pharmazeutika im größeren Maßstab mit Hilfe von P450-Enzymen sind nur wenige kommerzielle Anwendungen bekannt. Die oft zu niedrige Aktivität von P450-Enzymen, die schlechte Löslichkeit ihrer Substrate, Substrat- bzw. Produktinhibierung und die Abhängigkeit von teurem Koenzym NAD(P)H wirken sich limitierend für industrielle Anwendungen aus, wenngleich viele mögliche Lösungen dieser Probleme bisweilen vorgestellt wurden.^[39,42]

Die mikrobielle Oxidation von Steroiden repräsentiert eine kommerzielle Anwendung von Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Darunter ist die Biosynthese von Cortisol ausgehend von 11-Desoxycortisol mit *Curvularia lunata*-Zellen (angewandt von Schering AG, jetzt Bayer)^[47,48] und die Oxidation von Progesteron zu 11 α -Hydroxyprogesteron mit *Rhizopus sp.*-Zellen (angewandt von Pharmacia & Upjohn, jetzt Pfizer) zu nennen (Abbildung 3).^[49,50]

Eine weitere Anwendung ist die Biotransformation von Compactin zu dem cholesterinsenker Pravastatin mit *Streptomyces carbophilus*-Zellen (Daichi Sankyo Inc. Und Bristol-Myers Squibb).^[51] Die 6 β -Hydroxylierung wird hierbei von der CYP105A3 katalysiert.^[52,53]

Ein weiteres Beispiel ist die *de-novo*-Synthese von Artemisininsäure, einer Vorstufe des Antimalariamedikaments Artemisinin. Dazu wurde eine Multi-Enzym-Kaskade in *Saccharomyces cerevisiae* integriert. Diese beinhaltet unter anderem CYP71AV1 von *Artemisia annua*, welche für die Hydroxylierung von Amorphadien zu Artemisininalkohol zuständig ist.^[54]

Basierend auf diesem gentechnisch veränderten Hefestamm wurde eine Anlage von Sanofi für die Produktion von bis zu 60 Tonnen Artemisinin pro Jahr gebaut, die allerdings aufgrund eines Überangebots von extrahierten Artemisinin aus *A. annua* stillgelegt ist.^[55,56]

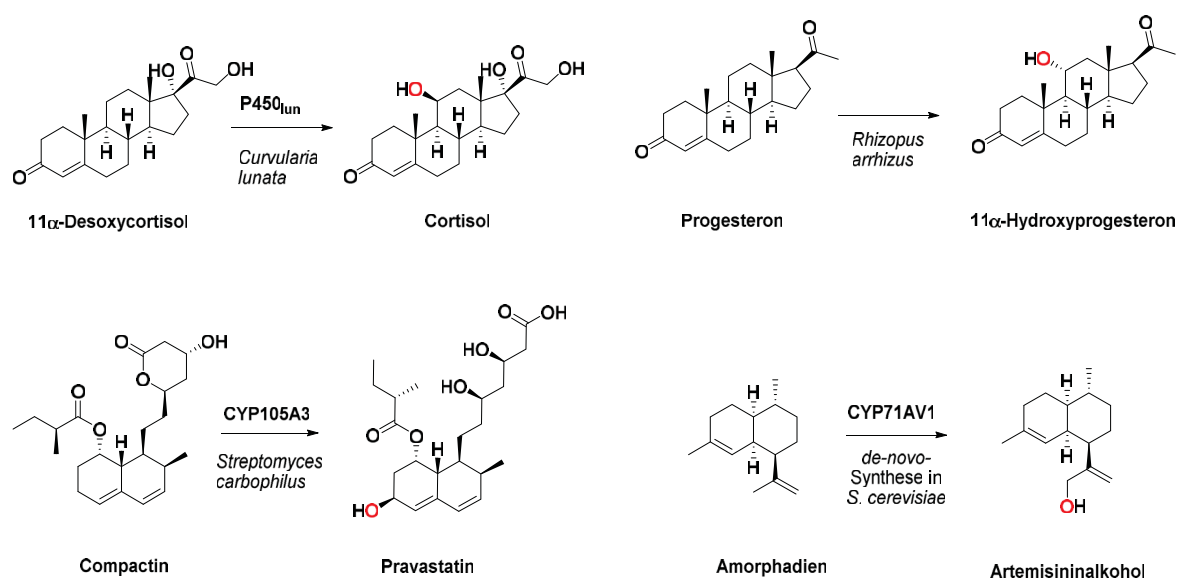


Abbildung 3. Industrielle Anwendungen von P450-Enzymen. Das eingefügte Sauerstoffatom ist rot markiert.

1.1.6 Funktionelle Entschlüsselung unbekannter Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Für die Entwicklung von neuen, P450-basierten, biokatalytischen Prozessen steht ein Genpool von über 52.000 klassifizierten P450-Sequenzen zur Verfügung.^[3] Allerdings sind die meisten dieser Sequenzen einer bestimmten Familie zugeordnet, ohne dass Informationen über die zelluläre oder biochemische Funktion bzw. des Substratspektrums bekannt sind. Sie werden daher auch als „*orphan P450s*“ bezeichnet.^[57,58] Zur Bestimmung der Funktionen unbekannter Enzyme (*deorphanization*) sind mehrere Methoden beschrieben worden.^[57,59–61] Falls die Funktion benachbarter Gene bekannt ist, kann bei Prokaryoten die Lokalisation des P450-Gens im Genom Hinweise liefern, da ungefähr 35 % der bakteriellen metabolischen Gene in Cluster konserviert sind.^[62,63] Eine andere Möglichkeit ist es, durch einen Sequenzvergleich mit charakterisierten P450-Enzymen auf das Substratspektrum zu schließen, wobei eine möglichst hohe Sequenzidentität vorliegen sollte.^[59]

Des Weiteren wäre es denkbar, anhand einer 3D-Struktur des Enzyms z. B. Docking-Studien durchzuführen, um potentielle Substrate zu identifizieren. Allerdings sind 3D-Strukturen nur bedingt verwertbar, da es bei Substratbindung zu strukturellen Veränderungen kommt, die sich nachteilig auf die Genauigkeit der Docking-Studien auswirken können.^[32] Bei 3D-Strukturen von P450-Enzymen mit co-kristallisierten Substraten ist zu erwähnen, dass das Substrat nicht immer in der Position des aktiven Zentrums vorzufinden ist, die für eine Hydroxylierung notwendig wäre.^[39]

Ebenfalls ist ein Screening nach Verbindungen, die eine Expression der „*orphan P450*“ im Wirtsorganismus induzieren, denkbar.^[64,65]

Eine vielversprechende Methode für endogene Substrate ist die nicht-zielgerichtete Metabolom-Analyse (*non-targeted metabolomics*). Dazu werden organische Extrakte von einem Organismus oder Gewebe hergestellt, welche die zu untersuchende P450 aufgrund eines Gen-Knockouts nicht mehr enthält. Dieser Extrakt wird als Substratbibliothek verwendet und mit der rekombinanten „*orphan P450*“ in Anwesenheit von NAD(P)H und Redoxpartnern inkubiert. Analyse und Vergleich dieses metabolischen Profils vor und nach der Inkubation ergibt Rückschlüsse über endogene Substrate der P450.^[66] Diese Methode wurde unter anderem erfolgreich für CYP154A1 von *Streptomyces coelicolor* angewandt (Kapitel 1.1.7).^[67]

Im Allgemeinen führt bei P450-Enzymen die Bindung eines Substrats zu einer charakteristischen spektralen Verschiebung der Absorption. Diese Absorptionsverschiebung resultiert aus einer Änderung des Spinzustandes von LS (415–417 nm) zu HS (390–394 nm) und wird auch Typ I-Spektrum genannt.^[68] Daher ist es möglich, eine große Bibliothek organischer Verbindungen nach diesem Typ I-Spektrum zu screenen.^[69] Hierbei ist allerdings zu beachten, dass nicht jede Bindung ein Typ I-Spektrum induziert und umgekehrt nicht jeder Ligand, der ein Typ I-Spektrum induziert, eine Umsetzung zur Folge hat.^[70–72]

Durch *in-vitro*-Umsetzungen vieler Substanzen aus einer Substratbibliothek und anschließender Analyse der Produkte sind eindeutigere Ergebnisse zu erzielen. Diese sehr arbeitsintensive Herangehensweise lässt sich vereinfachen, indem die erhaltenen Informationen der zuvor beschriebenen Methoden bei der Auswahl potentieller Substrate berücksichtigt werden. Auch die Verwendung einer Mischung von einer überschaubaren Anzahl potentieller Substrate kann den Arbeitsaufwand verringern.

Eine systematischere Methode für die Durchmusterung vieler Substanzen als potentielle Substrate wurde in Vorarbeiten am Institut für Biochemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf entwickelt. Dieses sogenannte Cluster-Screening wurde bei der Identifizierung des Substratspektrums von CYP154E1 und CYP154A8 angewandt.^[73] Clemens von Bühler stellte eine Bibliothek bestehend aus 51 organischen Verbindungen zusammen und unterteilte diese in neun Gruppen entsprechend ihrer chemischen Struktur, Größe und funktionellen Gruppen. Aufgrund der Varietät der Verbindungen der Gruppen können die strukturellen Anforderungen der Verbindungen untersucht werden, die für eine Umsetzung nötig sind. Des Weiteren erlauben die chromatographische Trennung und die massenspektrometrische Detektion der gebildeten Produkte Aussagen über die Chemo- und Regioselektivität der P450-Enzyme zu treffen.

1.1.7 Die CYP154-Familie

In dieser Arbeit sollten die bisher nicht charakterisierten Mitglieder der Familie CYP154 untersucht und für die Biokatalyse angewendet werden. Die Familie CYP154 besteht aus 35 Sequenzen, die in 18 Unterfamilien (A-S) unterteilt sind (<http://drnelson.uthsc.edu/biblioE.html>; Juni 2016). Alle Sequenzen stammen aus Actinobacteria, was sich in dem hohen GC-Anteil der DNA widerspiegelt. Sieben P450 dieser Familie wurden bereits heterolog in *E. coli* exprimiert und teilweise bezüglich ihres Substratspektrums charakterisiert, darunter CYP154A1^[67,74] und CYP154C1^[74,75] aus *Streptomyces coelicolor* A3(2), CYP154A8^[76–78] und CYP154C5^[36,76,79] aus *Nocardia farcinica* IFM 10152, CYP154E1^[73,80,81] und CYP154H1^[82] aus *Thermobifida fusca* YX, und CYP154C3^[83] aus *Streptomyces griseus*. Des Weiteren wurden drei Kristallstrukturen aus dieser Familie publiziert: CYP154C5 (PDB: 4j6c/4jbt/4j6d/4j6b)^[36] CYP154C1 (PDB: 1GWI)^[75] und CYP154A1 (PDB: 1ODO)^[74].

Die physiologische Aufgabe dieser Cytochrom-P450-Monooxygenasen ist unbekannt, nur für CYP154A1 wurde ein endogenes Substrat identifiziert. Es katalysiert die für P450 ungewöhnliche Zyklisierung eines Dipentaenon in einer Paternò-Büchi-ähnlichen Reaktion ohne die Notwendigkeit von Elektronentransferpartner (Abbildung 4).^[67]

Die CYP154-Familie zeichnet sich durch ihr vielseitiges Substratspektrum zwischen den einzelnen Mitgliedern aus und unterscheidet sich damit von vielen anderen Familien bakterieller P450-Enzymen.^[84] Trotz einer Aminosäuresequenz-Identität von mindestens 40 % unterscheiden sich die Substrate signifikant in Größe und Struktur (Abbildung 4). CYP154C1 setzt große Substrate wie die Markoldie YC-17 und Narbomycin zu den antibiotisch wirksamen Verbindungen Neomethymycin und Pikromycin um, während CYP154H1 eher kleine aromatische Verbindungen wie z. B. Ethylbenzol, Phenylalkylsulfide oder Indol oxidiert.

CYP154C3 und CYP154C5 besitzen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Proteinsequenz (67 %) und auch in ihrem Substratspektrum. Beide P450-Enzyme katalysieren die Hydroxylierung verschiedener Steroide wie z. B. Testosteron oder Progesteron regio- und stereoselektiv an der 16 α -Position. CYP154A8 und CYP154E1 scheinen eine höhere Substratpromiskuität aufzuweisen. Von Bühler *et al.* testeten insgesamt 51 verschiedene organische Verbindungen aus unterschiedlichen Substanzklassen, um Rückschlüsse auf das Substratspektrum zu ziehen.^[73]

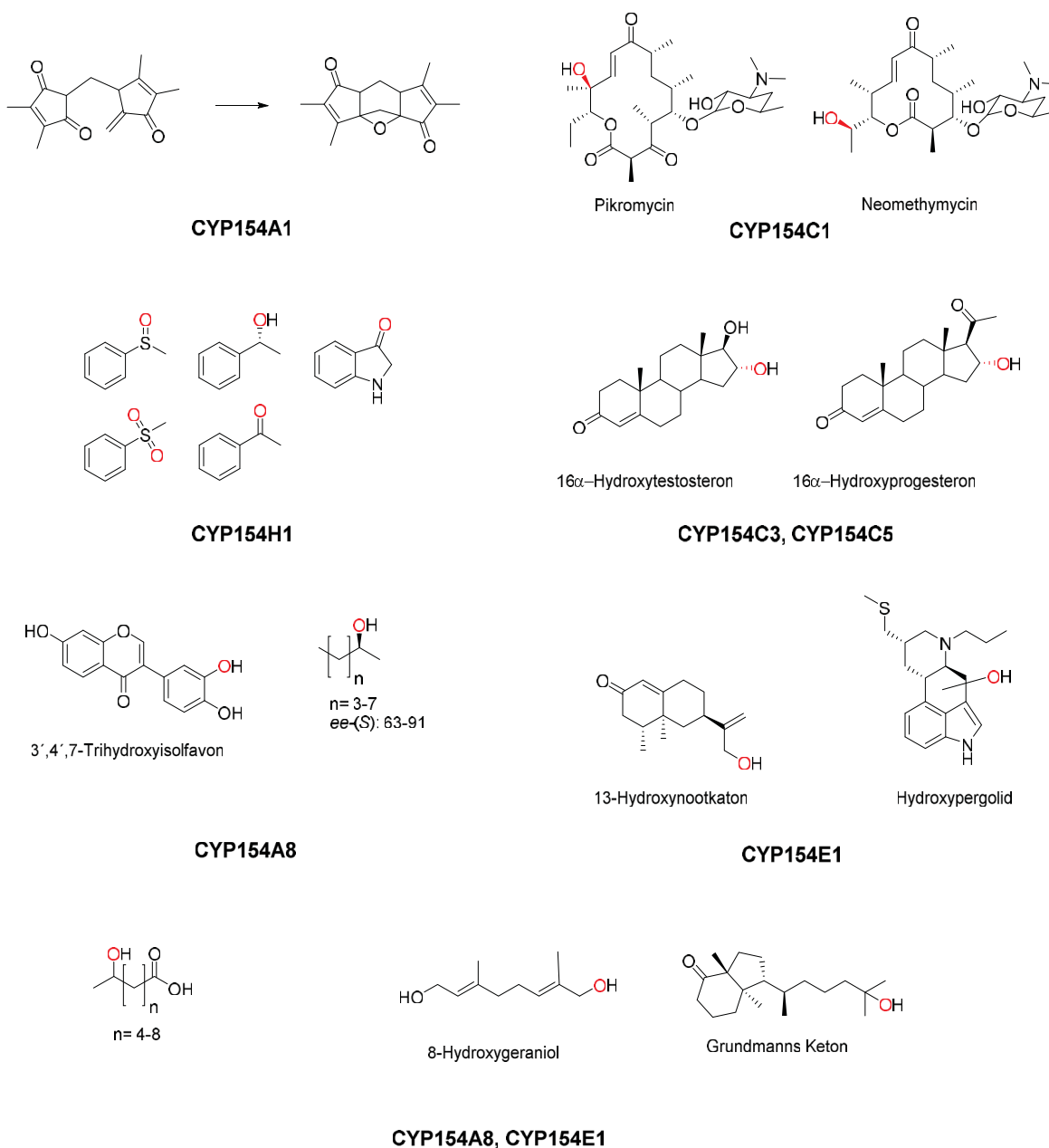


Abbildung 4. Auswahl von Reaktionen oder Produkten bereits charakterisierter Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus der Familie 154. Das eingefügte Sauerstoffatom ist rot markiert.

CYP154A8 und CYP154E1 setzten 23 bzw. 33 von diesen Verbindungen um, wobei sich in weiten Teilen ein überlappendes Substratspektrum abzeichnete. Beide P450-Enzyme setzten z. B. geradkettige Alkohole und Fettsäuren um und akzeptierten wie CYP154H1 kleinere aromatische Verbindungen wie Phenylalkylsulfide. CYP154A8 zeigte sich im Allgemeinen als selektiver und hydroxylierte in aufbauenden Untersuchungen auch *n*-Alkane (C7-C10) enantioselektiv subterminal (*ee*-(*S*): 63-91).^[85] CYP154E1 hingegen erwies sich als insgesamt aktiver und besaß in dem Screening eine höhere Substratpromiskuität als CYP154A8. Aufgrund ihrer hohen Substrat- und Reaktionsdiversität werden Mitglieder der CYP154-Familie als potentielle Kandidaten für die

Biokatalyse angesehen. Darüber hinaus ist es von enormer Bedeutung, noch nicht charakterisierte Mitglieder der CYP154-Familie zu untersuchen und mit verschiedenen Substraten zu testen.

1.2 Stilbenoide

1.2.1 Vorkommen und biologische Aktivität

Eine interessante Gruppe potentieller Produkte für die Entwicklung eines biotechnologischen Prozesses sind die Stilbenoide. Stilbenoide sind sekundäre Pflanzenstoffe und gehören zu der Gruppe der Phenylpropanoide. Sie bestehen aus einem 1,2-Diphenylethylen-Grundgerüst und mindestens eine Phenolgruppe. Aufgrund der Methylenbrücke sind die zwei planaren *Z*- und *E*-Konfigurationen möglich, wobei die *E*-Konfiguration in der Natur überwiegt.^[86] Stilbenoide dienen der Pflanze als Phytoalexine, die bei Verletzung oder mikrobiellen Befall gebildet werden.^[87,88] Über 1000 natürlich vorkommende Stilbenoide sind bekannt.^[86] Sie können prenyliert, geranyliert, glykosyliert oder auch als Oligomere vorliegen (Abbildung 5).^[89] Aufgrund ihrer (Poly)phenol-Struktur wurden sie intensiv als Antioxidantien zum Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS) untersucht.^[90]

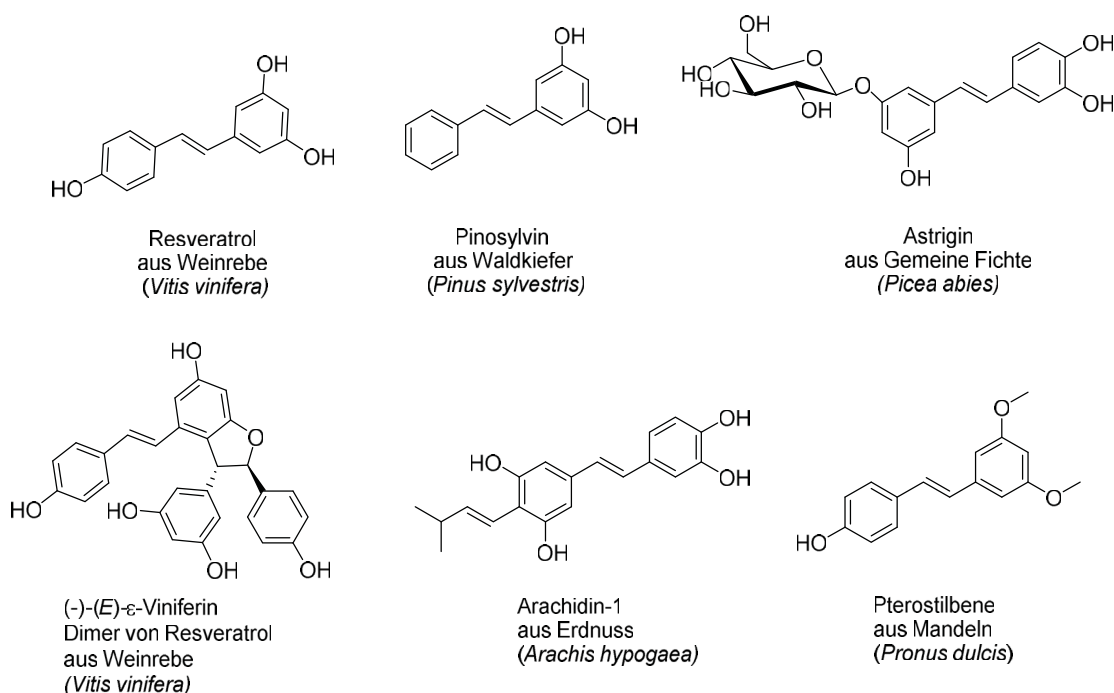


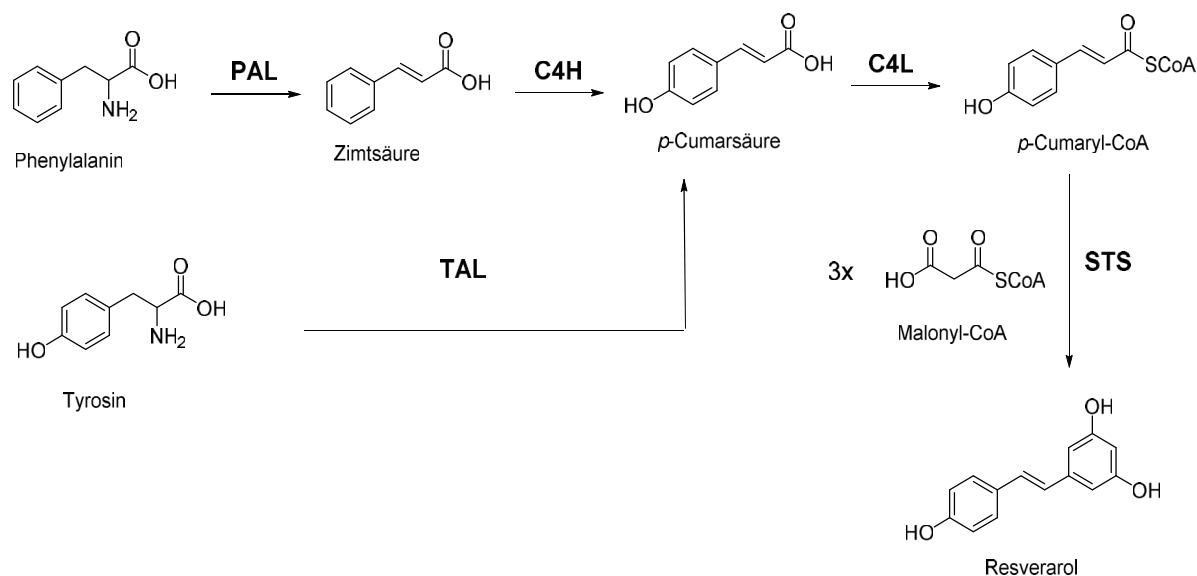
Abbildung 5. Auswahl natürlich vorkommender Stilbenoide^[91–96]

Stilbenoide sind in einer Vielzahl von Pflanzen wie z. B. in der Familie der Weinrebengewächse (*Vitaceae*) oder in verschiedenen Vogelknöterichgewächsen (*Polygonum*) zu finden.^[89] Sie wurden außerdem auch in Bakterien nachgewiesen.^[97,98] Der Vielblütige Knöterich (*Polygonum multiflorum*) enthält mindestens 21 Stilbenoide und wird, wie auch der Japanische Staudenknöterich (*Polygonum cuspidatum*), seit Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen Medizin als Tonikum, Anti-Aging-Mittel oder bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt.^[99,100]

Das bekannteste und am besten untersuchte Stilbenoid ist Resveratrol. Es kommt unter anderem in Weintrauben, Blaubeeren, Erdbeeren, Erdnüssen und verschiedene Knöterichgewächse (*Polygonum sp.*) vor.^[90,101,102] In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wurden die antioxidativen, neuroprotektiven, antimikrobiellen, radioprotektiven, entzündungshemmenden, antidiabetischen und antikanzerogenen Effekte beschrieben (für ausführliche Informationen siehe Review von Pangeni *et al.* 2014).^[103]

1.2.2 Biosynthese von Stilbenoiden

Die Biosynthese von Stilbenoiden erfolgt über den Phenylpropanoidweg mit Hilfe einer Stilbensynthase (STS), die zur Superfamilie der Typ III Polyketid-Synthasen gehört.^[104,105] Phenylalanin aus dem Shikimisäureweg wird durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) zu Zimtsäure umgewandelt und anschließend durch die Cytochrom-P450-Monooxygenase Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) zu *para*-Cumarsäure hydroxyliert (Schema 4). Alternativ kann Tyrosin durch die Tyrosin-Ammoniak-Lyase (TAL) direkt zu *para*-Cumarsäure umgewandelt werden. Die *para*-Cumarsäure wird durch die *p*-Cumarsäure-CoA-Ligase (C4L) aktiviert und durch die Stilbensynthase (STS) sequentiell mit drei Einheiten Malonyl-CoA zu einer Tetraketid-Zwischenstufe kondensiert. Daraufhin katalysiert die Stilbensynthase eine intramolekulare Adolreaktion unter Kohlenstoffdioxid-Abspaltung zu Resveratrol ((*E*)-3,4',5-Trihydroxystilben). Die Pinosylvinsynthase aus *Pinus sylvestris* akzeptiert auch Zimtsäure-CoA als Substrat, woraus dann Pinosylvin ((*E*)-3,5-Dihydroxystilben) entsteht.^[106]



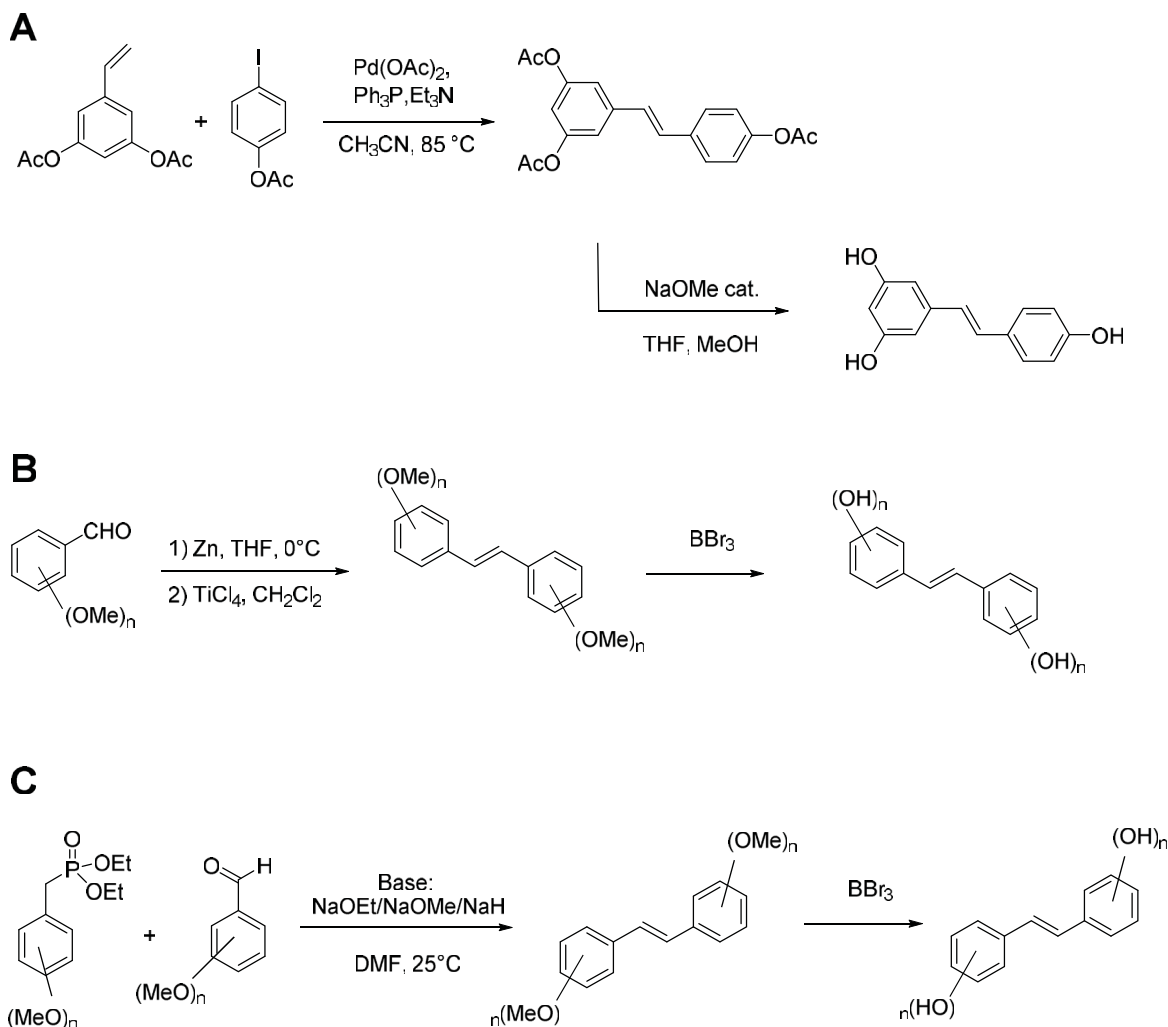
Schema 4. Biosyntheseweg von Resveratrol. Phenylalanin wird durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) zu Zimtsäure umgewandelt und anschließend durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) zu *para*-Cumarsäure hydroxyliert. Alternativ kann Tyrosin durch die Tyrosin-Ammoniak-Lyase (TAL) direkt zu *para*-Cumarsäure umgewandelt werden. Nach Aktivierung durch die *p*-Cumarsäure-CoA-Ligase (C4L) folgt eine sequentielle Kondensierung von drei Einheiten Malonyl-CoA und *p*-Cumaryl-CoA und anschließender Zyklisierung durch die Stilbensynthase (STS) zu Resveratrol. Geändert nach Jeandet *et al.*^[105]

Anschließend können verschiedene Enzyme wie Peroxidasen^[107], *O*-Glycosidasen^[108], *O*-Methyltransferasen^[109] oder Prenyltransferasen^[110] das Stilbenoid oligomerisieren bzw. modifizieren.

1.2.3 Darstellung von Stilbenoiden

Chemische Synthese

Die chemische Synthese von Stilbenoiden wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. In vielen Veröffentlichungen und Reviews wurde über die unterschiedlichen Synthesewege berichtet.^[86,111–114] Im Weiteren werden nur die geläufigsten Synthesewege erwähnt. Stilbenoide lassen sich über diverse Palladium-katalysierte Kreuzkupplungsreaktionen, wie die Suzuki-Miyaura-Reaktion, Negishi-, Stille- und Hiyama-Kupplung, herstellen.^[114]



Schema 5. Auswahl verschiedener Synthesewege von Stilbenoiden. A) Synthese von Resveratrol mit einer Heck-Reaktion.^[112] B) Synthese von symmetrischen Stilbenoiden mit einer McMurry-Reaktion (geändert nach Ali *et al.*^[115]) C) Synthese von Stilbenoiden mit einer HWE-Reaktion.^[114]

Bei diesen Reaktionen wird eine C-C-Bindung zwischen einem Arylhalogenid und einer entsprechenden phenylvinylmetallorganischen Verbindung in Anwesenheit von Palladium geknüpft. Eine weitere Reaktion dieser Art ist die Mirozoki-Heck-Reaktion, bei der das Arylhalogenid mit einer phenylvinyl-Verbindung verknüpft wird (Schema 5A).^[112]

Bei diesen Reaktionen wird vorrangig die *Z*-Konformation gebildet. Die Hydroxygruppen der Arylverbindungen können allerdings störend wirken und die Ausbeute verringern, weshalb Schutzgruppen erforderlich sind.^[116–118]

Eine palladiumfreie Methode für die Synthese von symmetrischen Stilbenoiden ist die McMurry-Reaktion (Schema 5B). Hierbei werden zwei Arylaldehyde reduktiv in Gegenwart einer niedervalenten Titanverbindung gekoppelt. Bei dieser Methode entsteht ausschließlich die *Z*-Konformation.^[115]

Übergangsmetallfreie Synthesewege von Stilbenoiden sind die Wittig-Reaktion oder die verwandte Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (HWE-Reaktion). Hierbei reagiert ein zuvor synthetisiertes Phosphor-Ylid (Wittig) oder Dialkylphosphonat (HWE, Schema 5C) mit dem substituierten Benzaldehyd. Die Reaktion benötigt 5-8 Schritte (inkl. Synthese der Phosphorvorstufen) und es entsteht vorwiegend eine Mischung aus den *E/Z*-Isomeren.^[86] Andrus *et al.* berichteten, dass bei der Verwendung von Diisopropylphosphonaten in der HWE-Reaktion ausschließlich *E*-Stilbenoide entstanden sind.^[119]

Biotechnologische Herstellung

Viele Strategien zur biotechnologischen Herstellung von Resveratrol wurden in den letzten Jahren vorgestellt.^[120–122] Aufgrund der Limitierung in der industriellen Anwendung von Pflanzenzellkulturen wie die langsame Wachstumsrate, das aufwendigere Produktionsverfahren, Gen-*silencing* etc. werden im Folgenden nur die Methoden vorgestellt, die auf genetisch veränderten Mikroorganismen basieren.^[122–124]

In den meisten beschriebenen Studien wurden die entsprechenden Enzyme des Biosynthesewegs von Resveratrol ganz oder teilweise in *E. coli* oder *S. cerevisiae* eingefügt.^[121] Zusätzlich mussten Vorstufen wie *p*-Coumarinsäure oder die Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin während der Biosynthese hinzugefügt werden. Lim *et al.* berichteten über den höchsten Produkttiter von Resveratrol.^[125] Sie integrierten eine C4L von *Arabidopsis thaliana* und die STS von *Vitis vinifera* in *E. coli* und produzierten 1,37 g/l Resveratrol ausgehend von *p*-Coumarinsäure. Bei Zugabe von Cerulenin konnte die Produktkonzentration auf 2,37 g/l gesteigert werden.^[125] Cerulenin inhibiert die Fettsäurebiosynthese und steigert so die intrazelluläre Konzentration von Malonyl-CoA, welches für die Stilbenoidsynthese notwendig ist (siehe Kapitel 1.2.2, Schema 4). Li *et al.* berichteten über eine *de-novo*-Synthese von Resveratrol ausgehend von Glucose oder Ethanol in *S. cerevisiae*.^[126] Sie integrierten dazu den vollständigen Biosyntheseweg in *S. cerevisiae* und exprimierten Gene zur Steigerung der Konzentration der Vorstufen. Sie erreichten dadurch einen Produkttiter von 416 mg/l bzw. 531 mg/l aus Glucose bzw. Ethanol.

Methoden zur mikrobiellen Synthese von anderen Stilbenoiden als Resveratrol sind nur wenige bekannt. Marienhagen *et al.* nutzten einen gentechnisch veränderten *E. coli* Stamm für die Produktion von 70 mg/l Pinosylvin ausgehend von Glucose.^[127] Sie integrierten dazu u.a. eine Pinosylvinsynthase aus *Pinus strobus*, die eine hohe Affinität gegenüber Zimtsäure-CoA hat. In einer kürzlich erschienenen Studie berichteten sie über einen gentechnisch veränderten *Corynebacterium glutamicum* Stamm, der aus den Vorstufen Zimtsäure, *p*-Coumarinsäure bzw. Kaffeesäure Pinosylvin, Resveratrol bzw. Piceatannol herstellte (Abbildung 6). Es wurden Produkttiter von 50-160 mg/l erreicht.^[128]

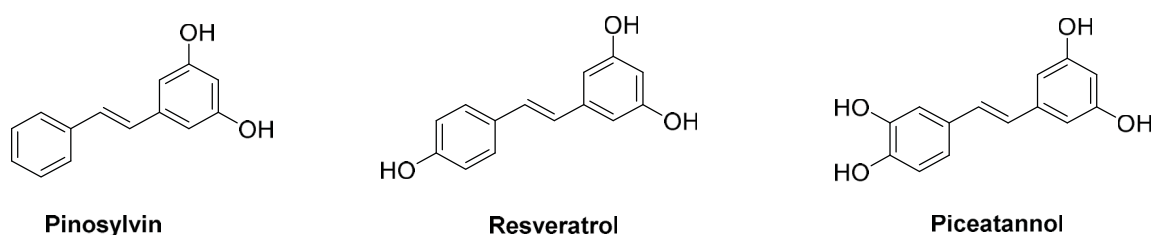


Abbildung 6. Abbildung der Strukturen von Pinosylvin, Resveratrol und Piceatannol

Yan *et al.* berichteten über die mikrobielle Synthese von Piceatannol.^[129] Sie hydroxylierten Resveratrol mit einer zwei-Komponenten abhängigen FAD-enhaltenden Monooxygenase (HpaBC) aus *E. coli* und erreichten in einer *E. coli*-Ganzzellumsetzung einen Produkttiter von 1,2 g/l.

1.3 Ziel der Arbeit

Cytochrom-P450-Monooxygenasen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, selbst nicht-aktivierte Kohlenwasserstoffe zu oxidieren und sind daher auch für biotechnologische Anwendungen interessant. Für die Entwicklung neuer P450-basierter biokatalytischer Prozesse steht ein Genpool von über 52.000 P450-Sequenzen aus Genomsequenzierungsprojekten zur Verfügung, die als Quelle für neue Anwendungen dienen können. Hierbei sind die cytosolischen bakteriellen P450 aufgrund ihrer, für biotechnologische Anwendungen praktikableren, Eigenschaften im Vergleich zu eukaryotischen P450 wie z. B. die effiziente Expression und höhere Aktivität von vorrangiger Bedeutung. Allerdings sind in den meisten Fällen die katalysierten Reaktionen sowie das Substratspektrum der neu identifizierten P450 unbekannt. Hinzu kommt, dass ihre physiologische Funktion und ihre Redoxpartner oft schwer zu identifizieren sind.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die bereits charakterisierten Mitglieder der CYP154-Familie eine hohe Aktivität, ein breites Substratspektrum sowie eine effiziente Expression in *E. coli* aufweisen. Aufgrund dieser interessanten Eigenschaften sollte die CYP154-Familie intensiver erforscht werden. Die detaillierten Ziele dieser Arbeit wurden wie folgt gesetzt:

- 1) Die Charakterisierung eines bisher nicht charakterisierten Mitgliedes der CYP154-Familie - CYP154F1 aus *Thermobifida fusca* YX.
- 2) Das Substratspektrum von CYP154F1 sollte mit denen der bereits charakterisierten CYP154-Enzymen verglichen und in Bezug auf die strukturellen Unterschiede zwischen diesen P450 analysiert werden. Dabei sollte die Identifikation der molekularen Determinanten, die zu Unterschieden der Substratspektren führen, im Vordergrund stehen. Hierzu sollten Homologiemodelle erstellt und Mutagenese-Studien durchgeführt werden. Des Weiteren sollte für eine genauere Analyse der beobachteten Ergebnisse parallel dazu CYP154F1 kristallisiert und die 3D-Struktur gelöst werden.
- 3) Ein weiteres Ziel war die Entwicklung und Optimierung eines neuen biokatalytischen Prozesses mit Hilfe von CYP154-Enzymen. Hierzu sollten (*E*)-Stilben und seine Derivate zur Herstellung von diversen Stilbenoiden oxidiert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Deorphanisierung von CYP154F1

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Substratspektrum weiterer, bisher nicht charakterisierter Mitglieder der Familie CYP154 zu bestimmen. Für dieses Vorhaben wurde CYP154F1 gewählt. CYP154F1 ist ein sogenanntes „*orphan P450*“ mit unbekannter Funktion. CYP154F1 stammt genau wie CYP154E1 und CYP154H1 aus *T. fusca* YX. CYP154F1 besitzt eine Aminosäuresequenz-Identität mit CYP154E1 von über 50 % und mit CYP154H1 von 43 %. Im Gegensatz zu CYP154E1 ist das Substratspektrum von CYP154H1 weniger vielfältig (siehe Einleitung, Kapitel 1.1.7). Aufgrund der höheren Sequenzidentität zu CYP154E1 wurden ähnlich interessante Eigenschaften von CYP154F1 in Bezug auf die Aktivität und der Substratpromiskuität erwartet und daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

2.1.1 Klonierung und Expression von unterschiedlich annotierten CYP154F1-Versionen

Zur Sequenz von CYP154F1 existieren in den Datenbanken zwei unterschiedliche Annotierungen, die sich in der Länge des N-Terminus unterscheiden (siehe Anhang 7.5.1). Die neuere Annotierung der Sequenz (373 Aminosäuren, GenBank: AAZ55783, *locus tag*: tfu_1748^[130]) zeigt eine um 162 Aminosäuren kürzere Version und wird im Folgenden CYP154F1_s.v. genannt. Nach der Klonierung des Gens in pET-28a(+) mit N-terminalen His-Tag wurde CYP154F1_s.v in *E. coli* exprimiert.

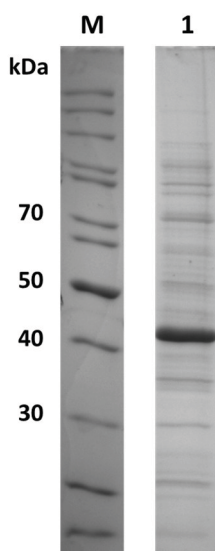


Abbildung 7. SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5 %) von der Expression von CYP154F1_s.v. (Tfu_1748). M = Proteinmarker, 1= lösliche Proteinfraction.

Das Zelllysate wurde nach der Expression mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert (Abbildung 7). Die Bande bei ungefähr 43 kDa stimmt gut mit dem berechneten Molekulargewicht von CYP154F1_s.v. (43.790 Da inkl. His-Tag) überein. Die Aufnahme eines CO-Differenzspektrums des Zelllysats zeigte keine für P450 übliche Absorption bei

450 nm. Stattdessen wurde eine Absorption bei 420 nm gemessen, was für ein falsch koordiniertes Häm und somit inaktives Protein sprechen könnte.^[131,132] Daher wurde die Sequenz der früheren Annotierung (CYP154F1_l.v. tfus3014;) ebenfalls kloniert und exprimiert. Diesmal wurde die charakteristische Absorption bei 450 nm im CO-Differenzspektrum gesehen. Allerdings war diese Version des Enzyms sehr instabil und aggregierte trotz Kühlung auf Eis innerhalb weniger Minuten. Teilweise konnte das Protein resuspendiert werden und zeigte weiterhin die Absorption bei 450 nm im CO-Differenzspektrum. Auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel in Abbildung 8 wurde via Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigtes CYP154F1_l.v. (Spalte 1) aufgetragen. In der Spalte 2 wurde das resuspendierte Aggregat aufgetragen. Vor der Präzipitation ist eine Bande bei ungefähr 58 kDa zu sehen, die dem berechneten Molekulargewicht von 60.621 Da (inkl. His-Tag) entspricht. Nach der Präzipitation des Proteins ist eine klare einzelne Bande bei ca. 48 kDa zu sehen (Spalte 2). Offensichtlich wurde ein definierter Teil des Proteins trunkiert.

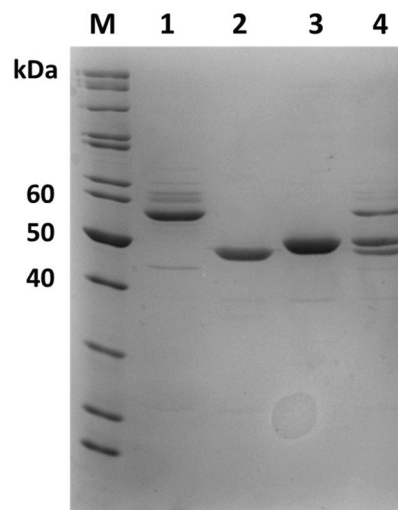


Abbildung 8. SDS-Polyacrylamid-Gel von gereinigten CYP154F1_l.v. (tfus3014) und CYP154F1. M = Proteinmarker, 1 = CYP154F1_l.v vor der Präzipitation, 2 = CYP154F1_l.v nach der Präzipitation, 3 = CYP154F1 (= CYP154F1_l.v minus 132 AS, siehe Erklärung unten), 4 = 1, 2 + 3. Es wurde jeweils eine Proteinmenge von jeweils ca. 1 µg pro Spalte aufgetragen.

Die genaue Größe des trunkierten Proteins (CYP154F1_l.v._trunkiert) wurde mit Hilfe der Elektronenspray-Ionisation Flugzeitmassenspektroskopie (ESI-TOF-MS) bestimmt (Abbildung 9). Das Massenspektrum zeigte bei 44.640 Da den höchsten Peak. Diese Masse entspricht mit guter Übereinstimmung der Masse von CYP154F1_l.v (58458 Da) abzüglich der N-terminalen 133 Aminosäuren (13.832 Da). Ebenfalls besaßen die Peaks mit 44.570 Da (CYP154F1_l.v abzüglich 135 AS) und 44.772 Da (CYP154F1_l.v abzüglich 132 AS) eine hohe Intensität. Dem Massenspektrum zufolge wurde CYP154F1_l.v. zwischen Threonin 132 und Alanin 135 gespalten (Abbildung 9, eingerahmt in Abbildung 10)

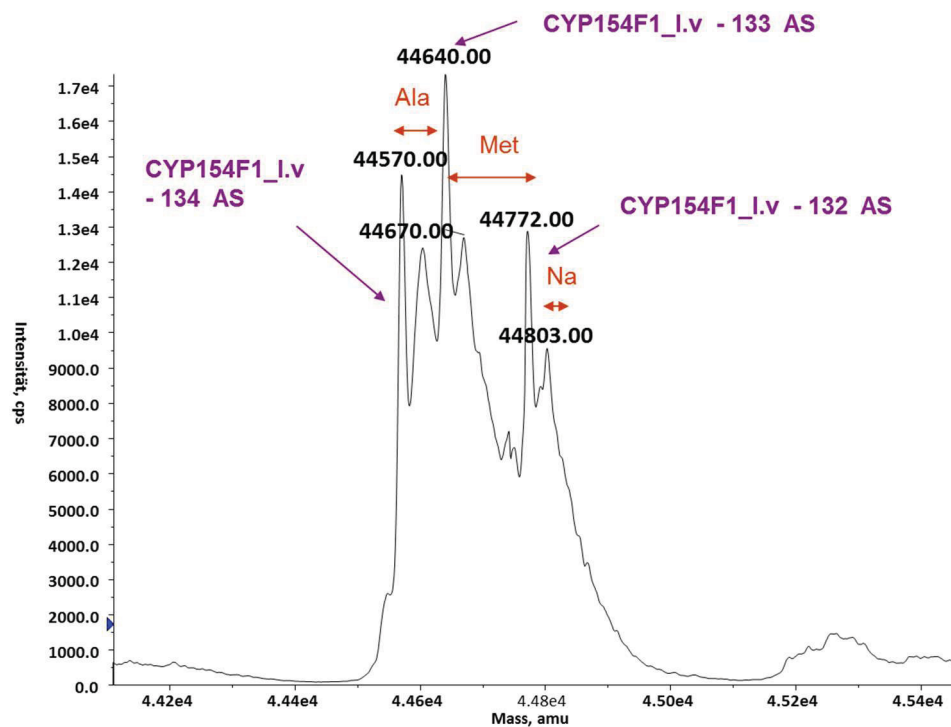


Abbildung 9. Dekonvolutes ESI-TOF-Massenspektrum des trunkeierten CYP154F1_l.v. AS = Aminosäure.

```

1 MAVSADHAAA GALPGARHPA GRRVRAGRRL LDHRLRSCTR RGGGCPVHRP AQPVRDPRPP
61 GVGDRAPRVP GAADLPADRG RRGECAAGPV AGRASRGSPR VAGAAPPFVR PRTQGASCHL
121 HPRRHHTNG GTMAAVPEPI VLVPGKSREQ ALQLREAGPL ARVVVEGLEV WALTHDREL
181 EALIDPRFRR NWRTWRALNE GEVATDHPVA AMVYLDNMLT VDGEAHRMR SPVAQAFTPR
241 RVELLRPRVT EIVNALLDQL AERDGTVDK TEFAYPLSMR VFSALFGIPE RDHGRMQQMV
301 NTAFFSPSSPE EVRAMREELD AFLDELIEDK RRSFGEDLTS ALVTATDEEH KLSDAELRDT
361 LWLLVTAGFE TTSSALANAV QTLTHPDQL AHLRSGSIW EDAIEEVLQ SSSVATLPFL
421 FAAEDVQIGD RTIRAGEPVL LAYLAANLDV ERYGEDAAEF DATQSRPRHL AFGHGPHTCL
481 GAALARLEME VALTTLFTEF PEVSLAEGEA PRLESVFIHA PAALPIRLGP RRTAA

```

Abbildung 10. Proteinsequenz der verschiedenen CYP154F1-Versionen. Die jeweiligen Startpunkte sind farblich hervorgehoben. Rot = Startpunkt von CYP154_l.v. n, blau = Startpunkt von CYP154F1, orange = Startpunkt von CYP154F1_s.v. Die Bruchstelle ist eingerahmt.

```

5'--ACC CCC ACC AAC GGA GGC ACC
ATG GCA GCA GTC CCA GAA CCC ATC
GTC CTC GTC CCA GGA AAA TCC CGC
GAG CAA GCC CTC CAG CTC CGT GAA
GCG GGG CCG CTT GCC CGA GTG GTG
GTC GAA GGT CTG GAA GTT TGG GCG
CTG ACC CAC GAC CGG GAG...etc---3'

```

Abbildung 11. Anfang der DNA-Sequenz von CYP154F1. Das alternative Startcodon (ATG) und das Startcodon von CYP154F1_s.v (GTG) sind rot markiert. Die mögliche ribosomale Bindungsstelle ist blau dargestellt.

Da die trunkierte Version von CYP154F1_l.v. nur etwa 30 Aminosäuren länger war als CYP154F1_s.v., aber im Vergleich zu dieser eine Absorption bei 450 nm zeigte, wurde CYP154F1_l.v. im Bereich der Schnittstelle auf DNA-Ebene untersucht. Dabei wurde eine potentielle ribosomale Bindestelle stromaufwärts vor dem Codon ATG, welches für Methionin 133 codiert, identifiziert (Abbildung 11 blau markiert). Mit der Annahme, dass das Codon von Met 133 das native Startcodon ist, wurde diese Version (im Folgenden CYP154F1 genannt, Abbildung 8, Spalte 3) analog zu den vorherigen CYP154F1-Versionen in pET-28a(+) kloniert und in *E. coli* exprimiert. Induziert wurde mit 0,2 mM IPTG. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 25°C und 140 rpm wurde 2,95 µmol (138 mg) des Proteins pro Liter TB-Medium hergestellt. Nach einer IMAC belief sich die erhaltene Menge des aufgereinigten Proteins auf 2,15 µmol (101 mg) pro Liter TB-Medium. CYP154F1 war lagerungsstabil und zeigte die charakteristische Absorption bei 450 nm im CO-Differenzspektrum.

In der SDS-PAGE-Analyse war eine Bande von ungefähr 49 kDa zu erkennen, welche mit der berechneten Masse (inkl. His-Tag) von 46.938 Da in guter Näherung übereinstimmt (Abbildung 8, Spalte 3).

2.1.2 Identifikation von heterologen Redoxpartner-Proteinen

Wie in der Einleitung erwähnt, benötigen Cytochrom-P450-Monooxygenasen für ihre Aktivität geeignete Redoxpartner-Proteine. In vorangegangenen Arbeiten wurden Redoxpartner-Proteine aus *T. fusca* YX exprimiert und in *in-vitro*-Experimenten mit CYP154F1 und CYP154E1 untersucht.^[133,134] Da mit dem in *T. fusca* YX vorkommenden Flavodoxin (Tfu_3023, Protein ID: YP_291079) weder in Kombination mit der Flavin-abhängigen Reduktase FdR1 (Tfu_1227, Protein ID: YP_289288) noch mit FdR2 (Tfu_1273, Protein ID: YP_289334) eine Aktivität von CYP154F1 rekonstituiert werden konnten, wurden bekannte heterologe Redoxpartner-Systeme untersucht.^[135] Als potentieller Elektronenüberträger wurde zuerst Putidaredoxin (Pdx) und Putidaredoxin Reduktase (PdR) aus *Pseudomonas putida* gewählt, da bekannt ist, dass mit diesem Redoxsystem die Aktivität mehrerer P450 aus der Familie 154 rekonstituiert werden konnte.^[77,79,82]

Die Kompatibilität von Pdx/PdR mit CYP154F1 wurde zuerst mit Fettsäuren und Terpene getestet, da diese Verbindungen von vielen P450 umgesetzt werden, unter anderem von den Familienmitgliedern CYP154E1 und CYP154A8.^[73]

Wie in Tabelle 1 zu sehen ist, ist die Kompatibilität durch das Redoxsystem Pdx/PdR gegeben. Zudem wurden in dieser primären Umsetzung drei Substrate von CYP154F1 gefunden. Octan- und Decansäure wurden zu weniger als 5 % umgesetzt und Geraniol zu 10 %.

Tabelle 1. Untersuchung der Kompatibilität von Pdx/PdR mit CYP154F1 anhand der Umsetzung von bekannten Substraten der Familie CYP154. Die Reaktionszeit betrug 16 h bei 25°C. Der Umsatz ergibt sich aus dem Verhältnis der Produktpeakflächen zu der Summe der Substrat- und Produktfläche der GC/MS-Analyse.

Substanz [200 µM]	Umsatz [%]
Octansäure	< 5
Decansäure	< 5
Dodecansäure	0
Tetradecansäure	0
Hexadecansäure	0
Octadecansäure	0
Geraniol	10
Farnesol	0

Da sich Redoxsysteme wie Adrenodoxin (Adx) und Adrenodoxin Reduktase (AdR) aus Säugetieren^[72], Flavodoxin (Fdx) und Flavodoxin Reduktase (FdR) aus *E. coli*^[135] sowie FdR aus *E. coli* und das Flavodoxin YkuN aus *Bacillus subtilis*^[73] ebenfalls als effektive Elektronenüberträger für die Rekonstitution der Aktivität verschiedener P450 erwiesen haben, wurden diese anhand der Umsetzung von Geraniol als Modells substrat verglichen (siehe Abbildung 12).

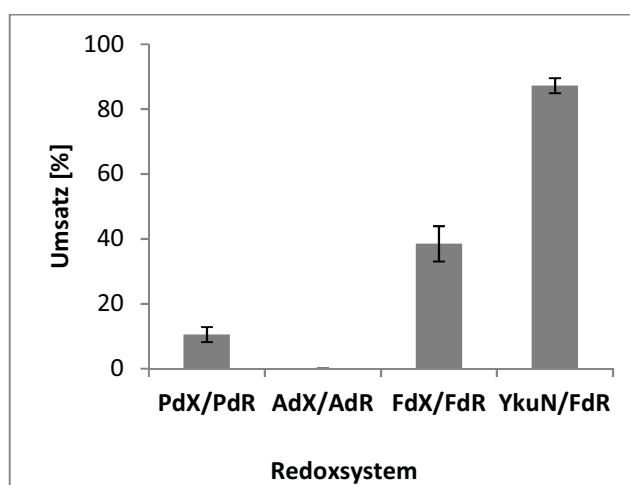


Abbildung 12. Vergleich potentieller Redoxsysteme mit CYP154F1 anhand der Umsetzung des Modells substrats Geraniol. Die Reaktionszeit betrug 16 h bei 25°C. Der Umsatz ergibt sich aus dem Verhältnis der Produktpeakflächen zu der Summe der Substrat- und Produktfläche der GC/MS-Analyse. Die Mittelwerte und Mittelwertabweichungen wurden aus zwei unterschiedlichen Experimenten bestimmt.

Die Redoxsysteme Fdx/FdR und YkuN/FdR zeigten beide einen höheren Umsatz als Pdx/PdR. YkuN/FdR zeigte gegenüber Fdx/FdR mit 80 % einen mehr als doppelt so hohen Umsatz und wurde daher in allen weiteren Versuchen als Redoxsystem für CYP154F1 verwendet.

2.1.3 Identifikation des Substratspektrums von CYP154F1

Zur Identifikation der Substrate von CYP154F1 wurde wie im von Bühler *et al.* beschriebenen Cluster-Screening vorgegangen.^[73] In diesem Cluster-Screening werden Substrate aus diversen chemischen Klassen getestet, die sich in Form und Größe oder auch anhand von funktionellen Gruppen unterscheiden. Mit dieser Methode ist eine Abschätzung der favorisierten Substrateigenschaften des zu untersuchenden P450-Enzyms möglich (siehe Einleitung, Kapitel 1.1.6). Da die Substratspektren von CYP154F1 und CYP154E1 verglichen werden sollten, wurden möglichst die gleichen organischen Verbindungen wie in dem Cluster-Screening von von Bühler *et al.* verwendet. Darüber hinaus wurden 50 weitere Substrate getestet. Die komplette Substratbibliothek beinhaltet verzweigte und geradkettige Fettsäuren und Alkohole, zyklische und azyklische Terpene, Thioether und Thioalkohole, Cumarin- und Flavonderivate, Lignin-Bestandteile sowie diverse zyklische Verbindungen und Aromaten (vollständige Liste aller getesteten Substrate siehe Tabelle 19 im Anhang).

Wie in Tabelle 2 und Abbildung 13 zu sehen ist, wurden 12 der über 100 getesteten Substrate umgesetzt. Die Substrate Geraniol und γ -Nonalacton zeigten mit 87 % und 70 % die höchsten Umsätze. Octansäure, Decansäure und 1-Octanol wurden jeweils an der subterminalen Position hydroxyliert (Abbildung 13). Geraniol und sein *Z*-Isomer Nerol wurden zu (*E*)-8-Hydroxygeraniol bzw. (*Z*)-8-Hydroxyneryl umgewandelt. α -Ionon wurde zu 3-Hydroxy- α -Ionon (31 %) und β -Ionon zu 4-Hydroxy- β -Ionon (17 %) umgewandelt. Weitere Oxidationsprodukte konnten nicht identifiziert werden, da die Fragmentierungsmuster der GC/MS-Analyse keine ausreichende Übereinstimmung mit der NIST 08 Datenbank aufwiesen.

Tabelle 2. Auflistung der umgesetzten Verbindungen der Substratbibliothek mit CYP154F1. Die Reaktionszeit betrug 16 h bei 25°C. Der Umsatz ergibt sich aus den GC/MS Peakflächen der Produkte im Verhältnis zu den Gesamtpeakflächen. Die Mittelwerte wurden aus zwei unterschiedlichen Experimenten bestimmt. n.i.= nicht identifiziert. ^a Stereochemie ist unbekannt.

Substrat	Umsatz [%]	Produktidentifikation und Verteilung [%]
Octansäure	8	7-Hydroxyoctansäure ^a (100)
Decansäure	9	9-Hydroxydecansäure ^a (100)
2,4,6-Trimethyloctanol	45	n.i. 2 Produkte (68/32)
1-Octanol	20	1,7-Octandiol ^a (100)
2-Octanol	24	n.i. 2 Produkte (60/40)
3-Octanol	8	n.i. (100)
2-Nonanol	11	n.i. (100)
Geraniol	87	(<i>E</i>)-8-Hydroxygeraniol (100)
Nerol	4	(<i>Z</i>)-8-Hydroxyneryl (100)
α -Ionon	31	3-Hydroxy- α -Ionon ^a (100)
β -Ionon	17	4-Hydroxy- β -Ionon ^a (100)
γ -Nonalacton	70	n.i. 3 Produkte (33/7/30)

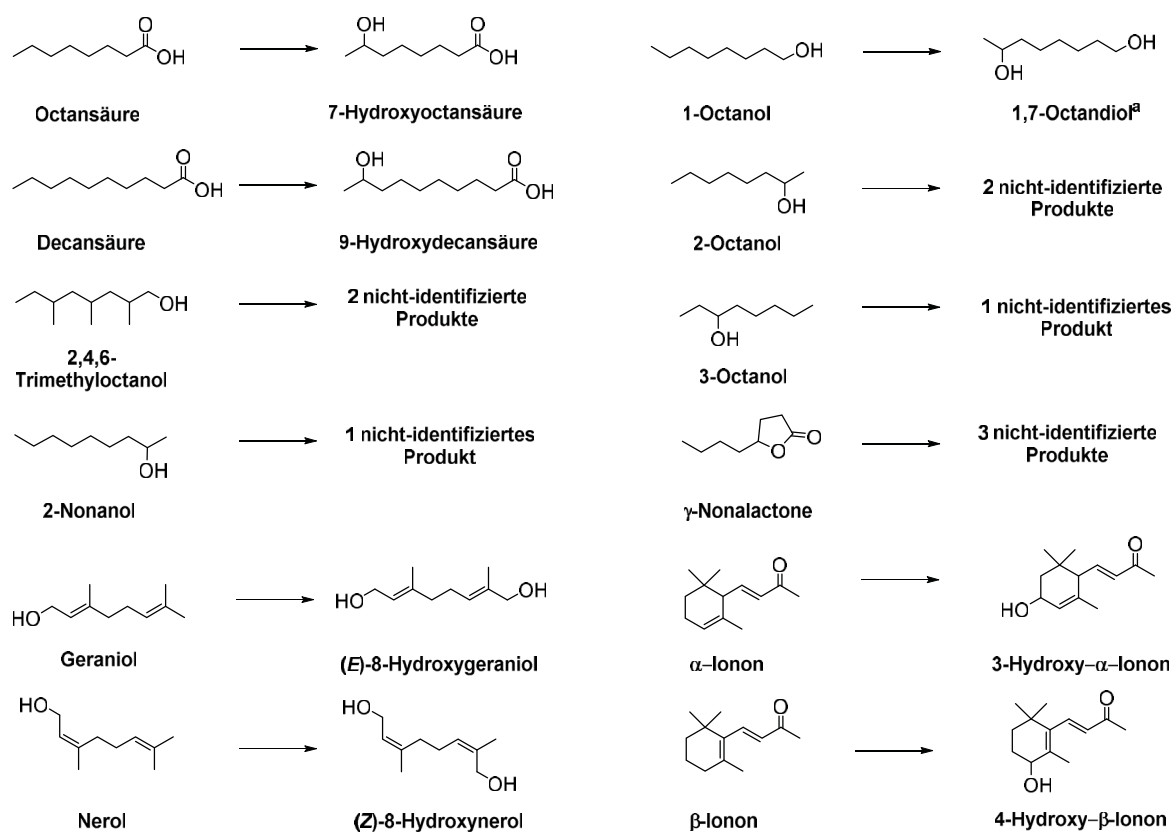


Abbildung 13. Strukturen der akzeptierten Substrate und die jeweiligen Oxidationsprodukte in der Umsetzung mit CYP154F1.

2.2 Kristallisation von CYP154F1

Um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten des Substratspektrums und der Aktivität von CYP154F1 und CYP154E1 zu erklären, sollten die Proteine auf molekularer Ebene untersucht werden. Hierzu sollte CYP154F1 kristallisiert und dessen 3D-Struktur durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden.

2.2.1 Das initiale Screening von Bedingungen zur Proteinkristallisation

Für das initiale Screening von Bedingungen für die Kristallisation wurde das His-*getaggte* Protein (His-tfu_1748) wie in Kapitel 5.3.1 beschrieben gereinigt (Abbildung 14).

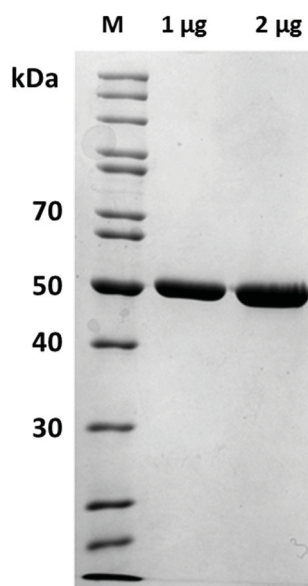


Abbildung 14. SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5 %) von gereinigtem CYP154F1 (His-tfu_1748) nach IMAC und SEC. M = Proteinmarker. Die Proteinmenge ist über den Banden angegeben.

Anschließend wurden die in Tabelle 18 (Kapitel 5.3.4) gezeigten Screening-Kits mit verschiedenen Konzentrationen des gereinigten Proteins (10 mg/ml, 15 mg/ml und 20 mg/ml) getestet. Diese Screening-Kits enthalten eine große Anzahl verschiedener Präzipitationsmittel und sind kommerziell erhältlich. Es konnten keine Kristalle bei diesen über 2000 getesteten Präzipitaten beobachtet werden. Aufgrund der hohen Flexibilität eines His-Tags und die daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der Kristallisation eines Proteins, wurde dieser mit Hilfe der Endopeptidase Thrombin erfolgreich entfernt (Abbildung 15).^[136,137]

Die mit Thrombin behandelte Variante (CYP154F1-Thr) enthielt nur noch das Tripeptid Gly-Ser-His als N-terminale Modifikation, welches der Thrombin-Schnittstelle entstammt. Diese Variante war somit 1,9 kDa kleiner, was gut mit der Laufstreckendifferenz zwischen der geschnittenen und der ungeschnittenen Variante übereinstimmte (Abbildung 15). Mit dieser CYP154F1-Variante wurden erneut acht Screening-Kits (fettgedruckt in Tabelle 18, Kapitel 5.3.4) bei einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml getestet. Zusätzlich wurden diese acht Screening-Kits mit dem Substrat Geraniol (1 mM) in Co-Kristallisationsexperimenten getestet. Nach zwei Wochen zeigten

sich bei einer Bedingung (MbClass II Suite: G12) der Co-Kristallisation kleine verwachsene Kristalle (Abbildung 16A). Die Bedingung setzte sich aus 0,1 M MES Puffer pH 6,5, 10 % PEG 8000 und 0,2 M $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ zusammen.

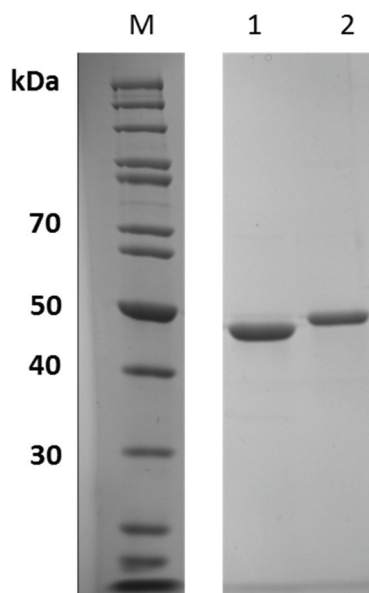


Abbildung 15. SDS-Polyacrylamid-Gel (12,5 %) nach dem Verdau von CYP154F1 (His-tfu_1748) mit Thrombin. M = Proteinmarker, 1 = 1 µg nach dem Verdau, 2 = vor dem Verdau.

2.2.2 Fine screening der Kristallisationsbedingungen

Um größere Kristalle zu züchten und unverwachsene Einkristalle zu erhalten, wurden die oben genannten Bedingungen in einem größeren Ansatz optimiert. Dabei wurde die Konzentration von $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ und PEG 8000 variiert. Wie in Abbildung 16B zu sehen ist, sind die Kristalle bei einer Konzentration von 0,3 M $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ und 20 % PEG 8000 weniger verwachsen. Da für die Röntgenstrukturanalyse ein Einkristall notwendig ist, wurden weitere Anpassungen unternommen. Hierzu wurden verschiedene Zusatzstoffe (Additive Screen) hinzugegeben.

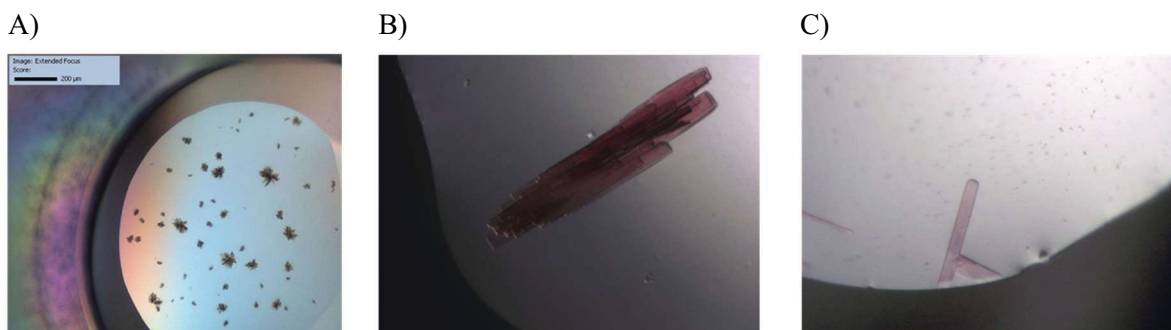


Abbildung 16. Kristalle von CYP154F1 nach: A) dem initialen Screening in 96-Well-Platten (Bedingungen: 0,1 M MES Puffer pH 6,5, 10 % PEG 8000, 0,2 M $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, 1 mM Geraniol); B) im *Fine screening* (Bedingungen: 0,1 M MES Puffer pH 6,5, 20 % PEG 8000, 0,3 M $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, 1 mM Geraniol); C) im Additiv-Screening (Bedingungen: 0,1 M MES Puffer pH 6,5, 20 % PEG 8000, 0,3 M $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, 1 mM Geraniol, 0,1 M Betain)

Wie in Abbildung 16C zu sehen ist, wuchsen nach Zugabe von 0,1 M Betain innerhalb von zehn Tagen bei 12°C einzelne Kristalle.

Die erhaltenen Kristalle wurden in anschließenden Röntgenbeugungsexperimenten am European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble (Frankreich) mit einem *beamline* ID30A-3 vermessen. Ein Kristall wurde in der symmetrielosen Raumgruppe P1 kristallisiert und die Röntgenstruktur konnte mit einer Auflösung von 3 Å bestimmt werden. Der Datensatz war allerdings aufgrund von Strahlenschäden nur zu 80 % vollständig, so dass weitere Kristallisierungsversuche unternommen wurden. Bei der Bedingung: 0,1 M MES Puffer pH 6, 20 % PEG 8000, 0,3 M Ca(OAc)₂, 15 mM Geraniol wuchsen erneut Kristalle. Diesmal konnte ein nahezu vollständiger Datensatz (über 98 %) mit einer Auflösung von 2,6 Å aufgenommen werden.

2.2.3 3D-Struktur von CYP154F1

Das Protein wurde in vier Monomere kristallisiert und die Struktur mit einer Auflösung von 2,6 Å gelöst. In Abbildung 17 ist die 3D-Struktur von CYP154F1 mit der für P450 charakteristischen und konservierten Faltung zu sehen.

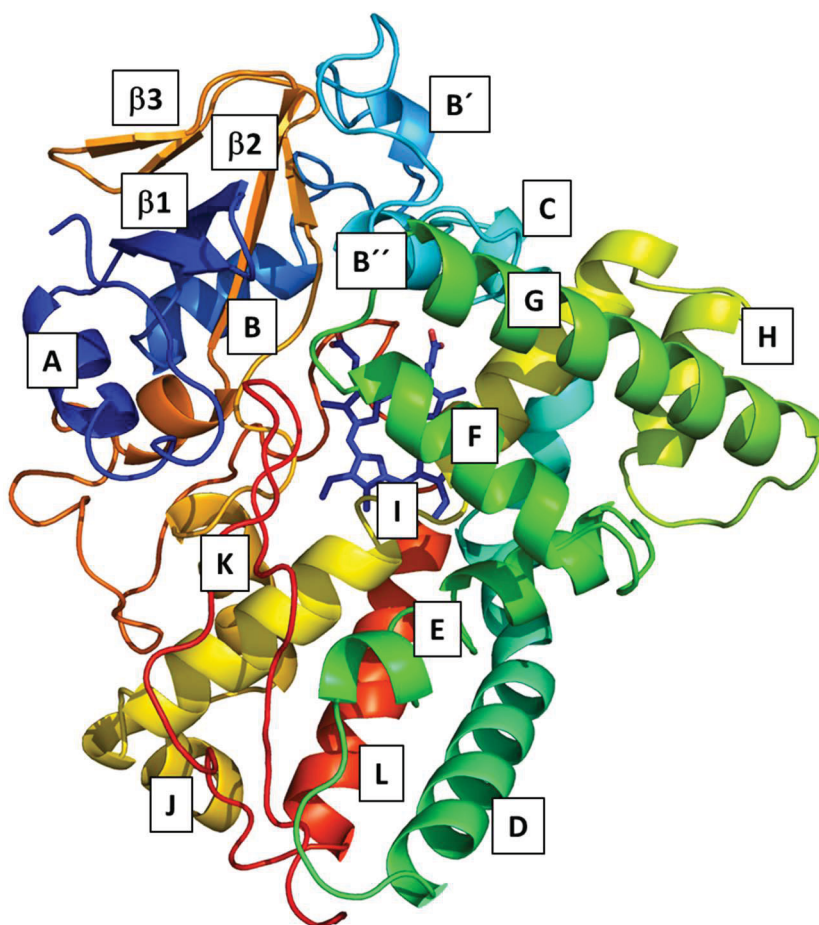


Abbildung 17. Gesamtstruktur von CYP154F1 mit markierten α -Helices und β -Faltblättern. Das Protein ist von blau (N-terminus) bis rot (C-terminus) gefärbt. Das Häm ist in Blau dargestellt.

Die Substratbindetasche und der Substrateingangskanal werden durch die Bereiche zwischen den Aminosäuren Pro76-Thr89, Ala171-Ser173, Met183-Asp187, Arg226-Thr238 und Val282-Phe289 geformt. Der Substrateingangskanal besitzt eine Verzweigung, in der ein Methionin ragt (Met183 in Abbildung 18A und B). Weiterhin ist eine polare Ausbuchtung im oberen Teil der Substratbindetasche zu sehen, die durch die Aminosäuren Thr89, Asp85, Thr234 und dem Peptidrückgrat der Kette Pro286-Phe287 geformt sind (Abbildung 18D und E). Trp230 verengt den Substrateingangskanal (Abbildung 18B und D). Dieser besitzt an der engsten Stelle einen Durchmesser von ca. 5 Å.

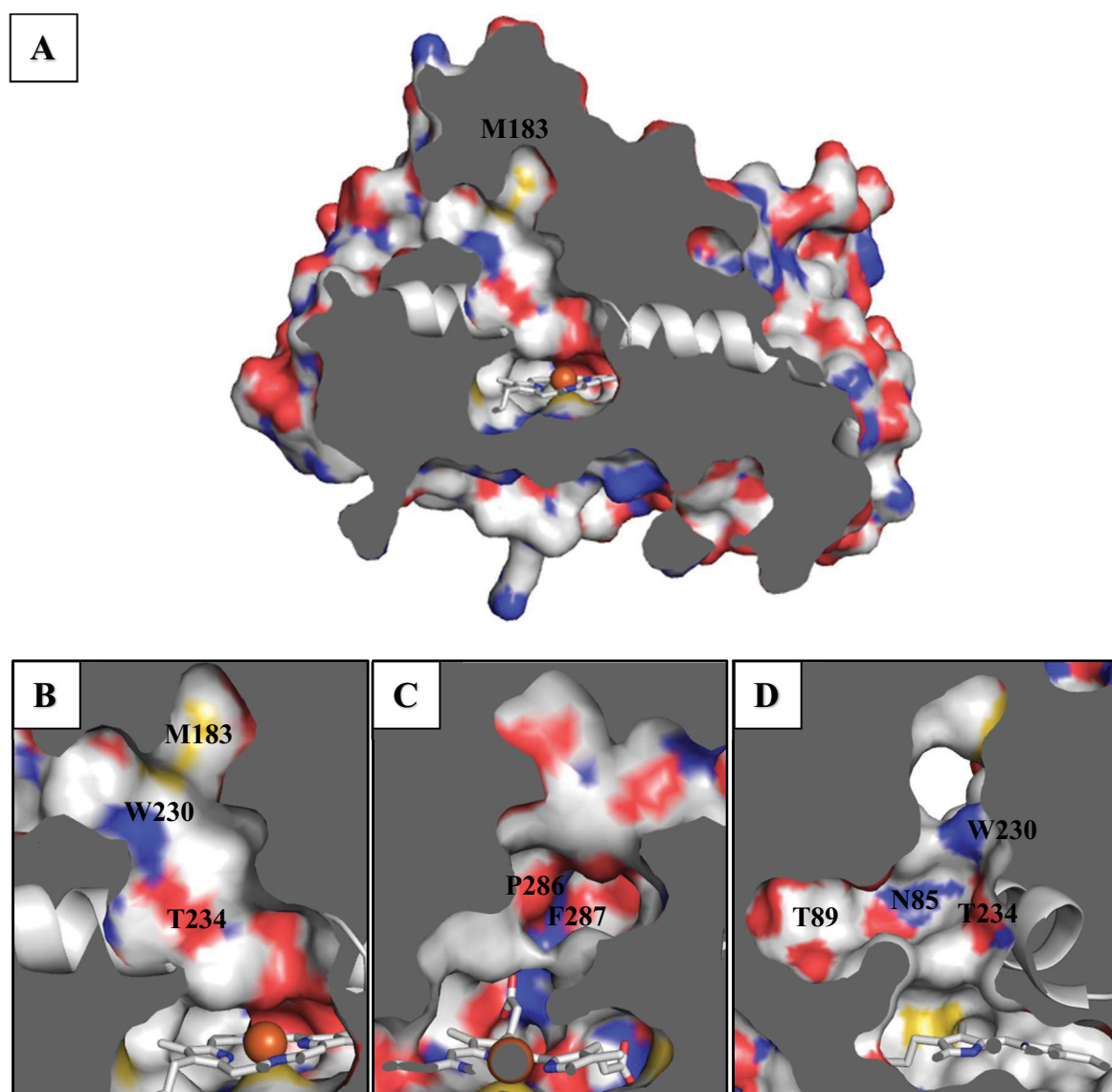


Abbildung 18. Querschnitte in der 3D-Struktur von CYP154F1. A) Querschnitt der Gesamtstruktur mit dargestellter I-Helix. B, C, D) Substratbindetasche und Substrateingangskanal aus verschiedenen Perspektiven: B) vor der I-Helix. C) zeigt die Abbildung B) um 180° gedreht. D) in Blickrichtung des Substrateingangskanals. In A, B, C und D sind die Sauerstoffatome in Rot, Schwefelatome in Gelb und die Stickstoffatome in Blau dargestellt.

Häm-Koordination in CYP154F1

Auf der Unterseite des aktiven Zentrums befindet sich das Häm, welches durch die konservierten Aminosäuren His94, Arg98, His345 stabilisiert und durch Cys347 an das Apoprotein gebunden ist. Das normalerweise ebenfalls konservierte Arginin (Arg299 in P450cam) entspricht in dieser Struktur Leucin in der Position 288, welches hier nicht zur Bindung der Hämgruppe beiträgt. Stattdessen bildet Arg58 mit der Carboxygruppe des Protoporphyrins eine Salzbrücke (Abbildung 19). Zusätzlich bildet das Tyr311 eine Wasserstoffbrückenbindung mit derselben Carboxygruppe. Weiterhin ist zu sehen, dass das Häm um 180° gedreht ist. Diese Anomalie wurde bislang nur für CYP154A1 und CYP121 beschrieben, wobei für CYP121 eine Mischung aus den beiden Orientierungen vorlag.^[74,138]

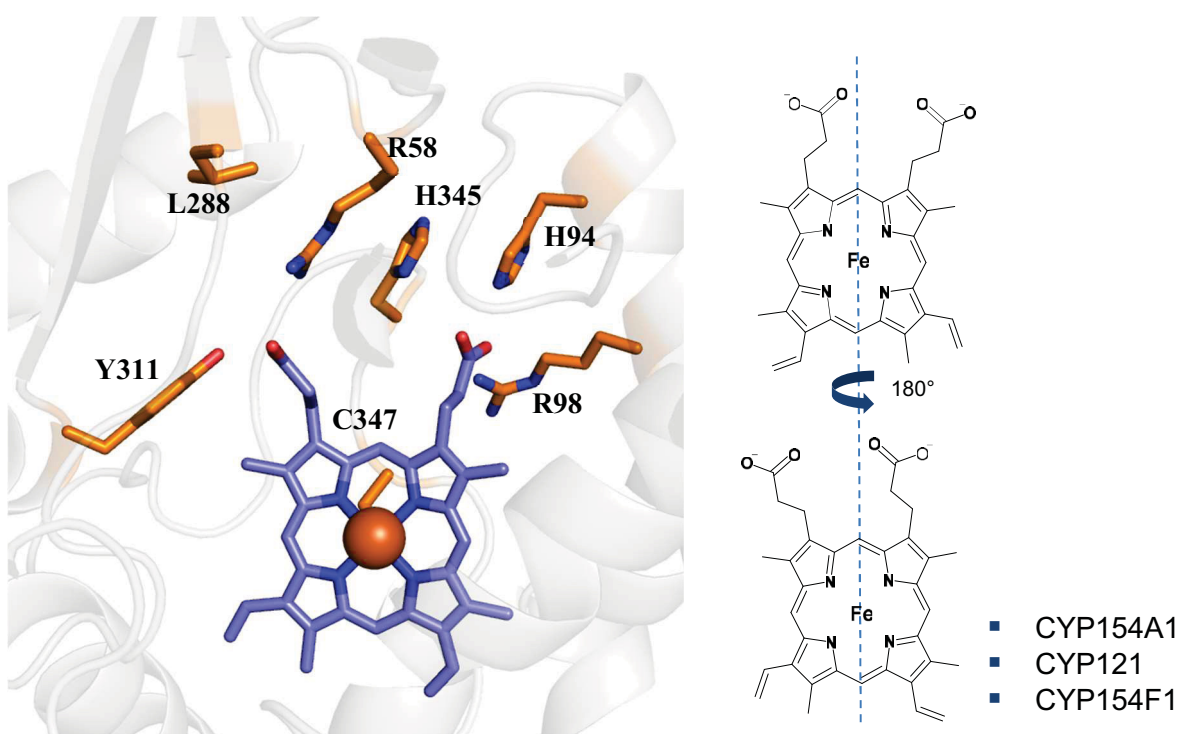


Abbildung 19. Häm-Koordination in CYP154F1. Die Bindung erfolgt über die Aminosäurereste R58, H345, H94, R98, Y311 und C347. L288 ist auch angedeutet, da die korrespondierende Aminosäure (Arg) in vielen P450 ebenfalls an der Bindung beteiligt ist. Das Häm ist im Vergleich zu den meisten anderen P450-Enzymen entlang der eingezeichneten vertikalen Achse um 180° gedreht. Bestätigte Ausnahmen sind CYP154A1 und CYP121.^[74,138]

Strukturvergleich von CYP154F1 mit publizierten 3D-Strukturen der CYP154-Familie und des Homologiemodells von CYP154F1

Die Tabelle 3 zeigt die Aminosäuresequenz-Identität und die RMSD-Werte (*root mean square deviation*) von CYP154F1 mit den bereits publizierten 3D-Strukturen der Familie CYP154. Der RMSD-Wert gibt an, wie weit die entsprechenden C-alpha Kohlenstoffatome der Proteine voneinander entfernt sind und kann daher als Maß für die strukturelle Übereinstimmung zweier Proteine verwendet werden. Für die Evaluation des Homologiemodells von CYP154F1, welches in Kapitel 2.3.1 für die Mutagenese-Studien verwendet wurde, wurden die entsprechenden

RMSD-Werte von der gesamten Struktur und des aktiven Zentrums berechnet. Das aktive Zentrum ist wie in Kapitel 2.3.1 definiert und setzt sich aus den elf Aminosäuren zusammen, die in der Abbildung 20B gezeigt sind.

Tabelle 3. Aminosäuresequenz-Identität und RMSD-Werte der Strukturen 1ODO^[74], 1GWI^[75], 4J6C^[36] und des verwendeten Homologiemodells mit CYP154F1. Das aktive Zentrum wurde als die elf Aminosäuren aus Abbildung 20B definiert.

	Aminosäuresequenz-Identität [%]	RMSD (C-alpha) [Å]
CYP154A1[1ODO]	41,3	1,129
CYP154C1 [1GWI]	45	1,231
CYP154C5 [4J6C]	43,3	1,388
Homologiemodell CYP154F1 gesamt	100	1,128
Homologiemodell CYP154F1 aktive Zentrum	100	0,916

2.3 Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung

CYP154F1 und CYP154E1 besitzen eine Aminosäuresequenz-Identität von 50 %. Trotz dieser hohen Sequenzidentität ist CYP154E1 in Anbetracht des Substratspektrums deutlich promiskuitiver als CYP154F1. In dem Cluster-Screening von von Bühler *et al.* wurden 51 Substrate getestet, wovon insgesamt 33 von CYP154E1 umgesetzt worden sind.^[73] Diese 33 akzeptierten Substrate unterschieden sich teils erheblich voneinander. So wurden große Substrate wie z. B. das Alkaloid Pergolid oder die Synthesevorstufe von Vitamin D - das Grundman's Keton - umgesetzt, aber auch kleine wie α -Pinen. Im Gegensatz zu CYP154E1 waren die akzeptierten Substrate von CYP154F1 (siehe Tabelle 2, Kapitel 2.1.3) von ihrer Größe und Funktionalität sehr ähnlich. CYP154F1 setzte vorrangig Alkohole und Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 8-10 C-Atomen um (vgl. Kapitel 3.1.3). Interessanterweise wurden alle identifizierten Substrate von CYP154F1 auch von CYP154E1 akzeptiert. Allerdings war die Aktivität von CYP154F1 gegenüber entsprechenden Substraten deutlich geringer als die von CYP154E1.

2.3.1 Identifikation von Schlüsselpositionen (*key residues*) von CYP154F1

Anhand von Mutagenese-Studien sollten als nächstes die Positionen in der Substratbindetasche identifiziert werden, die zu den unterschiedlichen Substratspektren von CYP154F1 und CYP154E1 führen. Dazu wurden zuerst die Substratbindetaschen miteinander verglichen, um Unterschiede zwischen den beiden Cytochrom-P450-Monooxygenasen zu finden, die Ziel für die Mutagenese-Studien sein könnten. Hierzu mussten Homologiemodelle erstellt werden, da zum Zeitpunkt keine Kristallstrukturen von CYP154F1 und CYP154E1 vorhanden waren. Als Vorlage diente hierfür die 3D-Struktur von CYP154A1 (1ODO^[74]), welches eine Aminosäure-Identität mit CYP154F1 von 42 % und mit CYP154E1 von 41 % besitzt.

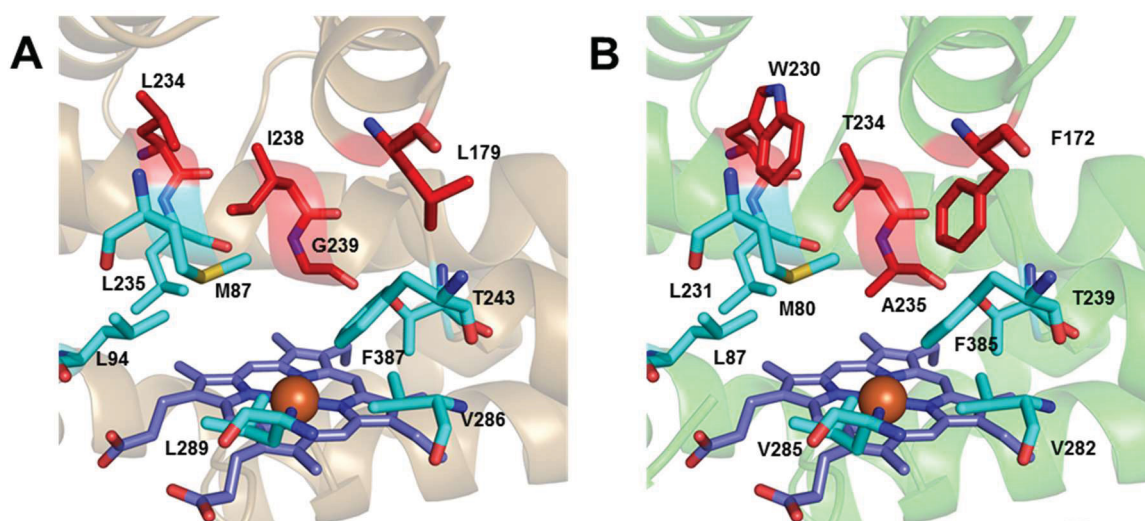


Abbildung 20. Homologiemodelle von A) CYP154E1 und B) CYP154F1. Die Aminosäuren, welche die Substratbindetasche bilden, sind als Stäbe gezeigt. Gleiche Aminosäuren an den korrespondierenden Positionen sind in Cyan dargestellt, verschiedene in Rot. Das Homologiemodell wurde mit dem SWISS-MODEL Server erstellt.^[139–142] Die Kristallstruktur PDB:1ODO von CYP154A1 diente als Template.

Nach dem Vergleich der Homologiemodelle konnten elf Aminosäurereste in einer Nähe zum Hämeisen von weniger als 12 Å identifiziert werden, welche die Substratbindetasche bilden und daher wahrscheinlich mit dem Substrat interagieren. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, sind sieben dieser elf Positionen in CYP154F1 und CYP154E1 identisch und vier mit unterschiedlichen Aminosäuren besetzt. Unterschiede sind in der I-Helix (W230, T234, A235) und an der F-G-Schleife (F172) zu sehen.

Tabelle 4. Vergleich der aktiven Zentren von CYP154F1/CYP154E1 und CYP154C5/CYP154C3. Die Aminosäuren der korrespondierenden Positionen befinden sich in der gleichen Zeile. Konservierte Aminosäuren sind rot markiert, unterschiedliche sind fett gedruckt und unterstrichen.

CYP154F1		CYP154E1		CYP154C5		CYP154C3	
Position	Aminosäure	Position	Aminosäure	Position	Aminosäure	Position	Aminosäure
80	M	87	M	84	M	92	M
87	L	94	L	92	F	100	F
172	F	179	L	180	F	188	F
230	W	234	L	239	Q	247	K
231	L	235	L	240	A	248	A
234	T	238	I	243	A	251	A
235	A	239	G	244	A	252	A
239	T	243	T	248	T	256	T
282	V	286	V	291	V	299	T
285	L	289	L	294	L	302	L
385	F	387	F	397	T	405	T

Die Familienmitglieder CYP154C3 und C5 (Aminosäuresequenz-Identität 67 %) wurden bereits charakterisiert und die 3D-Struktur von CYP154C5 gelöst.^[36] Aus der Kristallstruktur von CYP154C5 im Komplex mit dem Substrat Progesteron geht hervor, dass die korrespondierenden

(und in Tabelle 4 gezeigten) Positionen von CYP154C5 alle mit dem Substrat interagieren.^[36] Ein Vergleich dieser Positionen zeigt, dass neun von elf Aminosäuren in CYP154C3 und CYP154C5 identisch sind (Tabelle 4). Im Gegensatz zu CYP154F1 und CYP154E1 ist das Substratspektrum von CYP154C3 und CYP154C5 fast identisch. Beide Enzyme hydroxylieren Steroide regio- und stereoselektiv an der 16 α -Position.^[79,83] Die Überlegung war, die vier im Vergleich zu CYP154E1 unterschiedlichen Aminosäuren der Substratbindetasche von CYP154F1 so zu mutieren, dass sie denen von CYP154E1 entsprechen, um so gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Unterschiede in ihren Substratspektren und auf das breitere Substratspektrum von CYP154E1 zu ziehen.

Zuerst wurden dazu die vier Einfachmutanten F172L, W230L, T234I und A235G und eine Mutante, die alle vier Mutationen (4x Mutante) trägt, erstellt. Um mögliche Auswirkungen auf das Substratspektrum zu untersuchen, wurde eine kleine Auswahl von Substraten getestet, die nur von CYP154E1 umgesetzt wurden. Die Auswirkungen auf die Aktivität wurde anhand des zuvor verwendeten Modells substrats Geraniol untersucht, da CYP154E1 und CYP154F1 es als Substrat akzeptieren (Abbildung 21).

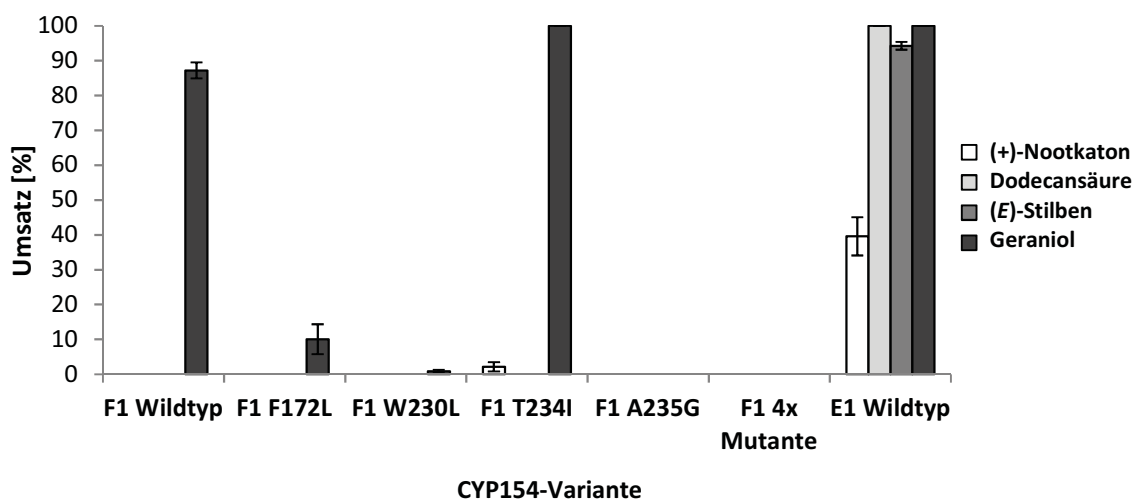


Abbildung 21. Umsetzung von 200 μ M (+)-Nootkaton, 200 μ M Dodecansäure, 500 μ M (*E*)-Stilben und 200 μ M Geraniol mit CYP154F1-Varianten und mit CYP154E1 Wildtyp. Die Reaktionszeit betrug 16 h bei 25°C. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unterschiedlichen Experimenten berechnet

Weder CYP154F1 noch seine Mutanten zeigten eine Aktivität gegenüber Dodecansäure oder (*E*)-Stilben. (+)-Nootkaton wurde von der T234I-Mutante zu einem geringen Ausmaß (2 %) umgesetzt. Das Produkt wurde als Nootkaton-13,14-epoxid identifiziert und ist ein anderes als in der Umsetzung mit CYP154E1 (13-Hydroxy-Nootkaton). Bei der Umsetzung von Geraniol zeigten A235G und die 4x Mutante keine Aktivität. Die F172L- und W230L-Mutanten wiesen mit 10 % und 1 % einen deutlich geringeren Umsatz als der Wildtyp auf. Die Mutante T234I und der Wildtyp CYP154E1 setzten Geraniol vollständig um und zeigten einen höheren Umsatz als der CYP154F1 Wildtyp (87 %). Das dabei entstandene Produkt konnte jeweils als (*E*)-8-Hydroxygeraniol

identifiziert werden. In einem weiteren Versuch mit einer Geraniolkonzentration von 10 mM zeigte die Mutante T234I mit 6,4 % einen vierfach höheren Umsatz als der Wildtyp (1,5 %).

2.3.2 Mutagenese an der Position T234 von CYP154F1

Weil durch den Austausch des polaren Threonin 234 mit dem hydrophoben Isoleucin ein deutlich höherer Umsatz von Geraniol erzielt werden konnte und der Austausch zu einem Umsatz von (+)-Nootkaton führte, wurden die Effekte der anderen hydrophoben Aminosäuren an dieser Position untersucht. Hierzu wurden die Mutanten T234M, T234F, T234L, T234V, T234A und T234W erstellt. Die Verwandten CYP154A1 und CYP154A8 tragen an der korrespondierenden Position ein Serin (S241 bzw. S242), weshalb auch diese Aminosäure eingeführt wurde. Bis auf T234W konnten die neu erstellten CYP154F1-Varianten in *E. coli* BL21(DE3) erfolgreich heterolog exprimiert werden. Die Auswirkungen der Mutationen wurden wieder in einer Reaktion mit Dodecansäure, (+)-Nootkaton, (*E*)-Stilben und Geraniol getestet (Abbildung 22).

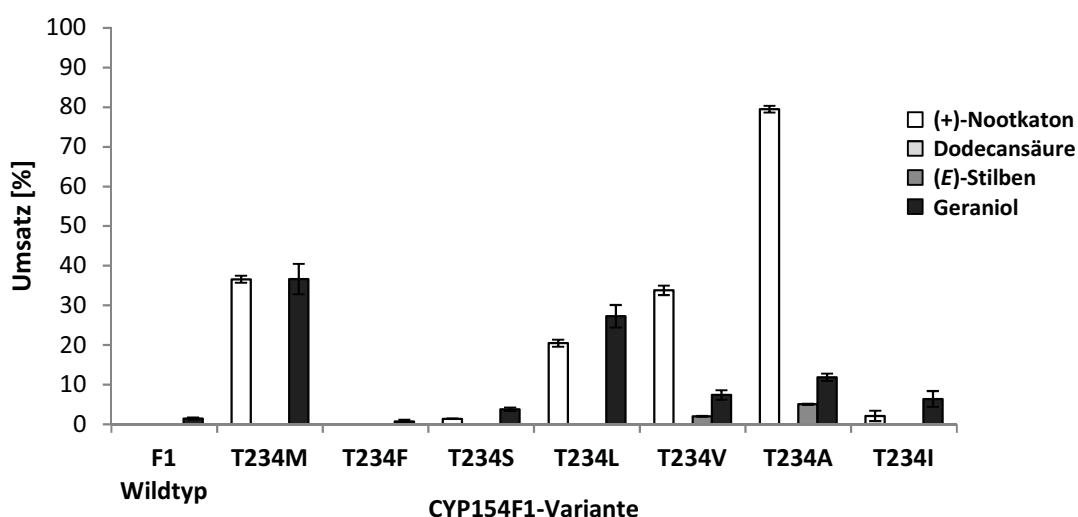


Abbildung 22. Umsetzung von 200 μ M (+)-Nootkaton, 200 μ M Dodecansäure, 500 μ M (*E*)-Stilben und 10 mM Geraniol mit CYP154F1 Mutanten an der Position 234. Die Reaktionszeit betrug 16 h bei 25°C. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unterschiedlichen Experimenten berechnet

(+)-Nootkaton wurde von allen Mutanten außer T234F zu Nootkaton-13,14-epoxid umgesetzt. Die höchste Aktivität zeigte die Variante T234A mit einem Umsatz von fast 80 %. T234M und T234V zeigten mit 37 % und 34 % eine vergleichbare Aktivität wie CYP154E1 (40 %). Dodecansäure wurde von keiner CYP154F1-Variante umgesetzt. (*E*)-Stilben wurde nur von den Varianten T234V und T234A im geringen Ausmaß umgesetzt (2 % und 5 %). Die Mutanten hydroxylierten von (*E*)-Stilben nur einen aromatischen Ring in *para*-Position, während CYP154E1 und seine Mutanten beide in *para*-Position hydroxylierten (siehe Kapitel 2.4). In der Reaktion mit einer Geraniolkonzentration von 10 mM zeigten alle Mutanten außer T234F (0,7 %) einen höheren Umsatz als der Wildtyp (1,5 %). Die Mutationen an Position 234 zu Methionin oder Leucin führten mit 37 % bzw. 27 % zu den höchsten Umsätzen von Geraniol.

2.3.3 Kinetische Parameter und Kopplungseffizienz von der Umsetzung von Geraniol

Aufgrund der hohen Umsatzsteigerung um den Faktor 24,5 bzw. 18,5 für die Mutanten T234M und T234L im Vergleich zum Wildtyp in der Reaktion mit Geraniol wurden diese hinsichtlich ihrer kinetischen Parameter sowie ihrer Kopplungseffizienz analysiert (Tabelle 5). Die Kopplungseffizienz ist als das Verhältnis zwischen der Stoffmenge des gebildeten Produktes und der Stoffmenge des verbrauchten NADPHs definiert.

Tabelle 5. Kinetische Parameter und Kopplungseffizienz von CYP154F1 und den Mutanten T234M und T234L in der Umsetzung von Geraniol.

	Wildtyp	T234M	T234L
K_M [mM]	$0,426 \pm 0,06$	$0,142 \pm 0,02$	$0,137 \pm 0,02$
K_{cat} [min^{-1}]	$1,6 \pm 0,07$	$17,2 \pm 0,65$	$15 \pm 0,6$
Katalytische Effizienz (K_{cat}/K_M) [$\text{min}^{-1}/\text{mM}$]	3,75	121	109,5
Kopplungseffizienz [%]	$2,1 \pm 0,1$	$27,2 \pm 1,4$	$21,1 \pm 0,4$

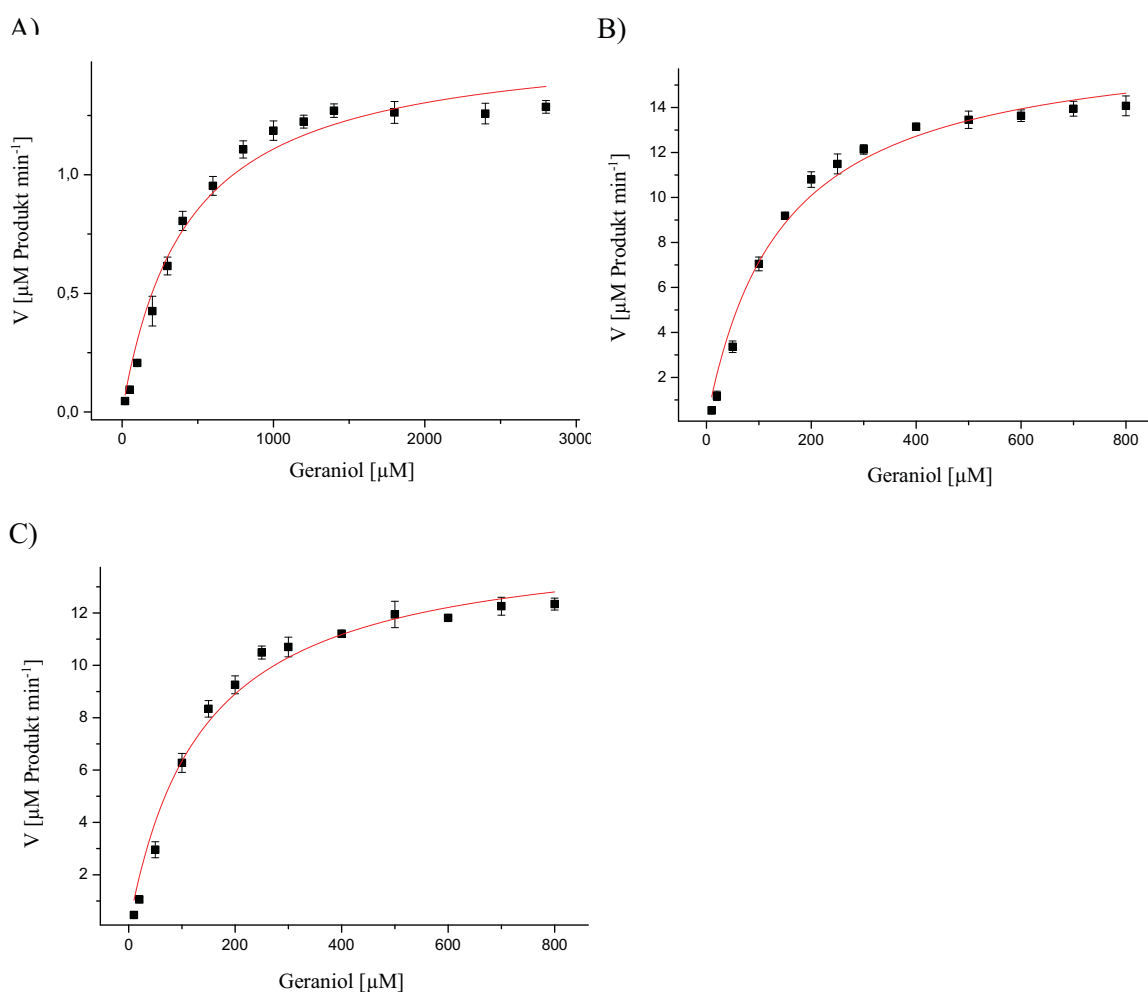


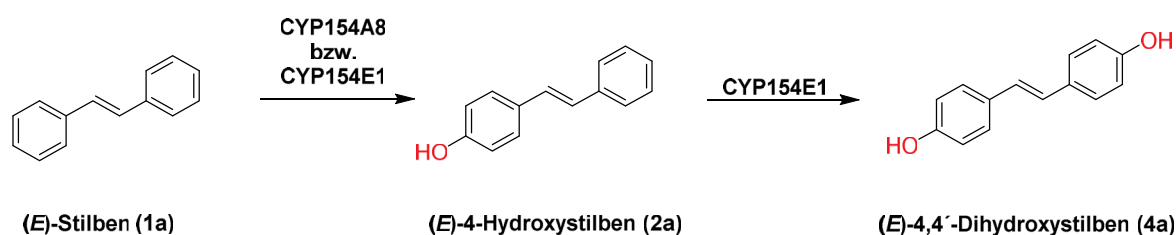
Abbildung 23. Umsatzrate in Abhängigkeit von der Geraniolkonzentration. V = initiale Reaktionsgeschwindigkeit. Die Kurve wurde nach der Michaelis-Menten-Gleichung nicht linear mit "OriginPro 9G" (OriginLab Corporation, Northampton, USA) angepasst.

Der K_M -Wert des Wildtyps war mit 426 μM 3-mal so hoch wie der K_M -Wert der Mutanten T234M (142 μM) und T234L (137 μM). T234M hatte mit 17,2 min^{-1} den höchsten K_{cat} -Wert in der Geraniol-Umsetzung und einen um fast 11-mal höheren als der des Wildtyps (1,6 min^{-1}). Durch den niedrigeren K_M -Wert und den höheren K_{cat} -Wert von T234M gegenüber dem Wildtyp ergab sich eine über 32-fache Steigerung der katalytischen Effizienz. Die Kopplungseffizienz war bei T234M und T234L mit 27,2 % bzw. 21,1 % fast um das 13-Fache bzw. 10-Fache höher als die des Wildtyps (2,1 %).

2.4 Regioselektive Hydroxylierung von (*E*)-Stilben und dessen Derivaten

2.4.1 Screening von CYP154-Enzymen für die Oxidation von Stilbenen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, einen auf der CYP154-Familie basierten neuen biokatalytischen Prozess zu entwickeln. Da sich während des Substratscreenings abzeichnete, dass CYP154F1 ein enges Substratspektrum aufweist, wurden interessante Substrate auch mit CYP154E1 und CYP154A8 getestet. Diese beiden Enzyme wurden aufgrund ihrer literaturbekannten hohen Substratpromiskuität und ihrer Verfügbarkeit im Institut gewählt.^[73]



Schema 6. Umsetzung von (*E*)-Stilben mit CYP154A8 und CYP154E1. Die eingefügten Hydroxygruppen sind in Rot dargestellt.

Tabelle 6. Umsetzung von 0,5 mM (*E*)-Stilben mit Enzymen aus der Familie CYP154.

P450	Produkt und Umsatz [%]
CYP154A8	(<i>E</i>)-4-Hydroxystilben (42,5)
CYP154E1	(<i>E</i>)-4,4'-Dihydroxystilben (93,5)
CYP154F1	0

Wie in Tabelle 6 und Schema 6 zu sehen ist, zeigten CYP154A8 und CYP154E1 eine Aktivität gegenüber (*E*)-Stilben. Weiterhin wiesen beide Enzyme eine absolute Regioselektivität für die *para*-Position auf. (*E*)-Stilben (**1a**) wurde in einer CYP154A8-katalysierten Reaktion zu 42,5 % zu (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) und in einer CYP154E1-katalysierten Reaktion zu 93,5 % zu (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) umgesetzt. Aufgrund der höheren Aktivität und der zweifachen Hydroxylierung von (*E*)-Stilben wurde CYP154E1 für die weiteren Untersuchungen gewählt.

2.4.2 Konstruktion von CYP154E1-basierten Mutanten

Um die Aktivität von CYP154E1 gegenüber (*E*)-Stilben weiter zu erhöhen, wurde mittels semi-rationalen Proteindesigns eine Auswahl von CYP154E1-Mutanten erstellt. Dabei wurde der Fokus auf die Aminosäurereste gelegt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Substrat interagieren. Diese werden auch als Aminosäuren der ersten Sphäre bezeichnet.^[143] Die Identifikation dieser Reste erfolgte mit Hilfe eines Homologiemodells, welches mit Hilfe des SWISS-MODEL Servers^[139–142] angefertigt wurde. Als Vorlage wurde die Kristallstruktur von CYP154A1 aus *S. coelicolor* A3(2) verwendet (PDB: 1ODO, Aminosäuresequenz-Identität 41 %). Anhand dieses Modells wurden innerhalb einer Distanz von weniger als 15 Å zum Hämeisen neun Aminosäurereste ausgewählt (Abbildung 24). Diese Aminosäuren an den Positionen L94, T178, L179, L234, L235, I238, G239,

V286 und M388 wurden hauptsächlich durch kleine und unpolare Aminosäuren wie Alanin und Valin ausgetauscht. Dadurch sollte das Volumen der Substratbindetasche vergrößert und eine hydrophobe Umgebung für das recht große und hydrophobe (*E*)-Stilben geschaffen werden. Weiterhin wurden die ausgewählten Positionen zu den korrespondierenden Aminosäuren der bereits charakterisierten P450-Enzyme der Familie 154 ausgetauscht. Die korrespondierenden Aminosäuren wurden mit Hilfe eines Proteinsequenzalignments mit CYP154E1 identifiziert (siehe Anhang, Kapitel 6.5). So wurden zum Beispiel die Mutationen L94F, T178F, L234Q, V286T und M388Q eingefügt, da die entsprechenden Aminosäuren in CYP154C1, CYP154C3 und CYP154C5 vorkommen und diese P450-Enzyme große Substrate wie Steroide und Makrolide umsetzen (siehe Einleitung Kapitel 1.1.7).

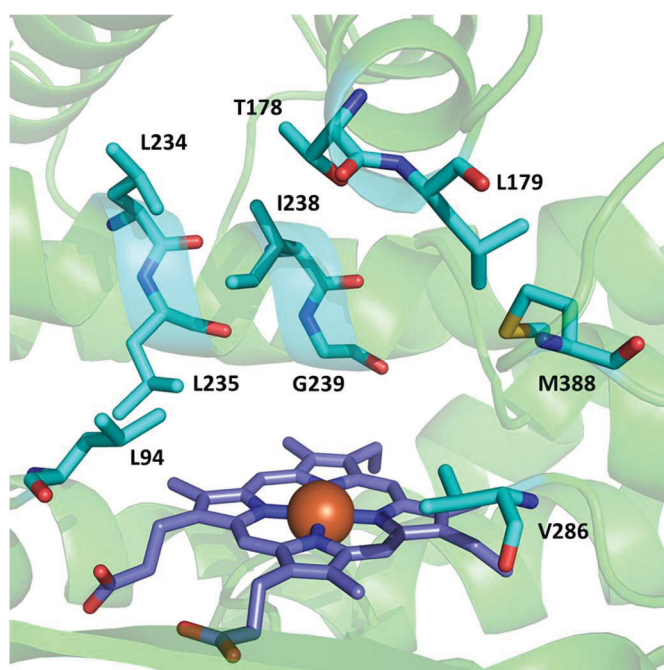


Abbildung 24. Aktives Zentrum von CYP154E1. Die für die Mutagenese ausgewählten Aminosäurereste sind in Cyan abgebildet. Das Homologiemodell wurde mit Hilfe des SWISS-MODEL Servers^[139–142] erstellt und basiert auf der Kristallstruktur von CYP154A1 (PDB: 1ODO) von *S. coelicolor* A3(2).

2.4.3 Aktivität der CYP154E1-Varianten gegenüber (*E*)-Stilben.

Zu Beginn wurde die Aktivität der 31 erstellten CYP154E1-Mutanten mit der des Wildtyps bei einer Substratkonzentration von 0,5 mM Stilben und einer Inkubationszeit von 17 h verglichen (Abbildung 25). 15 der 31 Mutanten zeigten keine Aktivität gegenüber (*E*)-Stilben. Mit elf Mutanten war ein niedrigerer Umsatz als mit dem Wildtyp zu verzeichnen. Bei sechs Mutanten war der Umsatz mit über 94 % höher als der des Wildtyps. Alle aktiven Mutanten zeigten keine Veränderung des Hydroxylierungsmusters und waren weiterhin 100 % regioselektiv für die *para*-Position von (*E*)-Stilben.

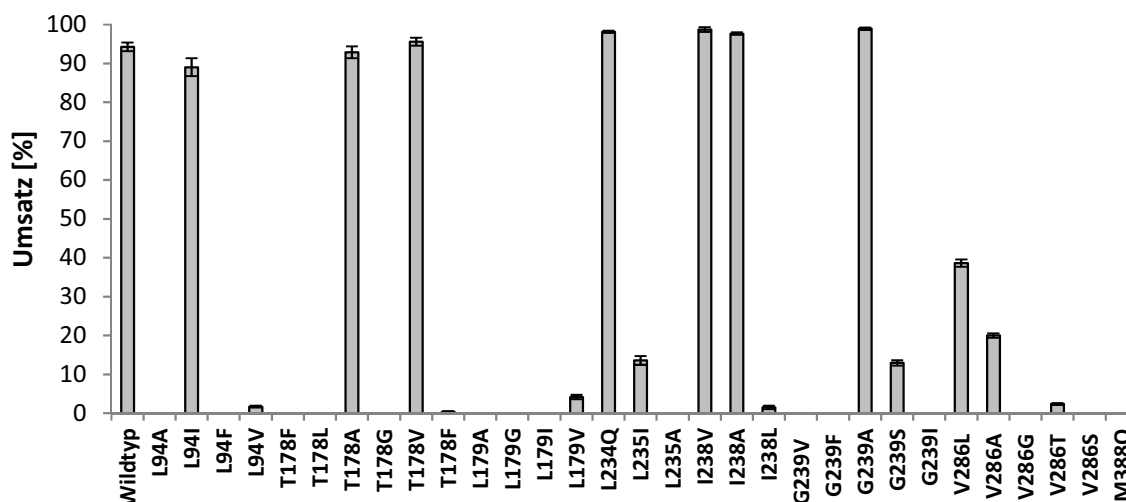


Abbildung 25. Umsetzung von 0,5 mM (*E*)-Stilben (1a) mit CYP154E1 Wildtyp und den erstellten Mutanten. Die Inkubationszeit betrug 17 h bei 25°C. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unterschiedlichen Experimenten berechnet.

Um die Unterschiede der sechs aktivsten Mutanten gegenüber (*E*)-Stilben zu verdeutlichen, wurde die Reaktion mit einer kürzeren Inkubationszeit von 30 min wiederholt (Abbildung 26). Die Mutationen T178A und T178V befinden sich in der F-G-Schleife, welche zu der SRS2 und SRS3 gehören. Diese Mutanten erreichten mit einem Umsatz von 6,4 % bzw. 10,7 % vergleichbare oder geringfügig höhere Werte gegenüber dem Wildtyp (5,9 %). Der Austausch von Glycin durch Alanin an der Position 239 führte zu einer fast zehnfachen Steigerung des Umsatzes (55 %). Die Mutationen I238V, L234Q und I238A wiesen mit 17,3 %, 16,9 % und 15,6 % vergleichbare Umsätze auf. Die Positionen L234, I238 und G239 befinden sich alle inmitten der I-Helix in der Nähe des Häms und gehören zur SRS4.

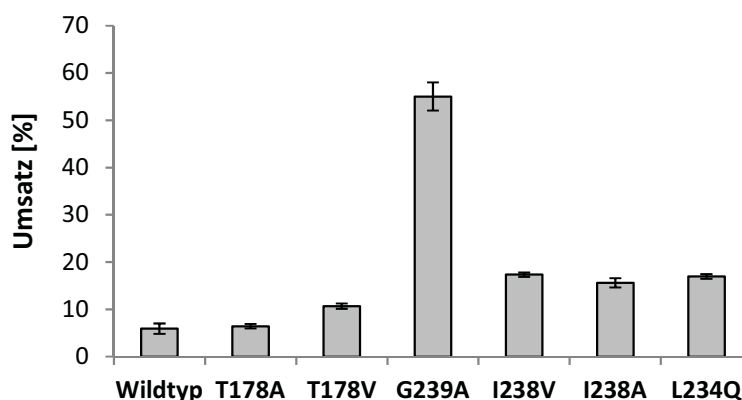


Abbildung 26. Umsetzung von 0,5 mM (*E*)-Stilben mit CYP154E1 Wildtyp und den sechs aktivsten Mutanten. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 25°C. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unterschiedlichen Experimenten berechnet.

2.4.4 Generierung von CYP154E1-Mehrfachmutanten

Im nächsten Schritt wurden die Mutationen, die einen signifikanten Effekt auf die Aktivität hatten, kombiniert. Die Mutante mit dem höchsten Umsatz von (*E*)-Stilben (G239A) diente hierzu als Template, woraus die Doppelmutanten I238V/G239A, I238A/G239A und L234Q/G239A, und die Dreifachmutanten L234Q/I238A/G239A und L234Q/I238V/G239A erzeugt wurden. Die Effekte wurden anhand der Umsetzung von (*E*)-Stilben und von dem Zwischenprodukt (*E*)-4-Hydroxystilben untersucht (Abbildung 27).

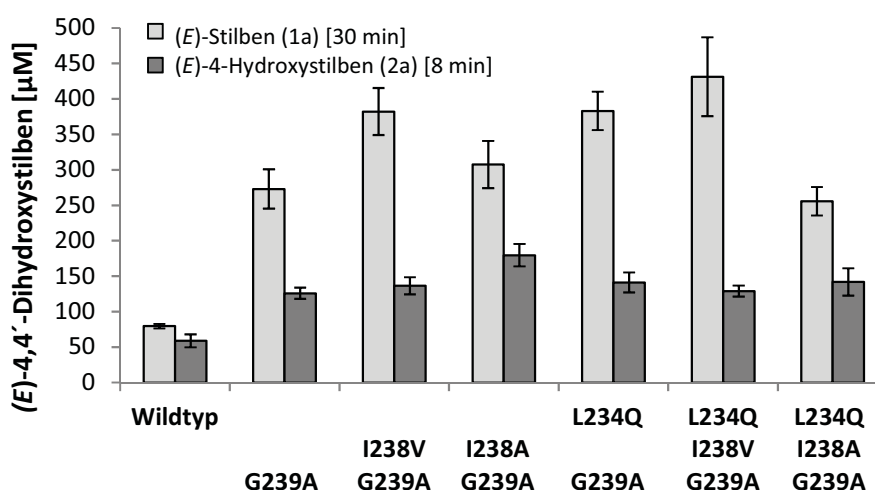


Abbildung 27. Umsetzung von 0,5 mM (*E*)-Stilben (30 min) und 0,5 mM (*E*)-4-Hydroxystilben (8 min) mit CYP154E1 Wildtyp und den Mehrfachmutanten. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unterschiedlichen Experimenten berechnet.

Mit Ausnahme von der Mutante L234Q/I238A/G239A wurde mit allen Mehrfachmutanten ein höherer Umsatz von (*E*)-Stilben als mit der Einfachmutante G239A und dem Wildtyp erreicht (Abbildung 27). Die Dreifachmutante L234Q/I238V/G239A erzielte hierbei mit 431 μM die höchste Produktkonzentration. Die Mutanten I238V/G239A und L234Q/G239A wiesen eine vergleichbare Produktkonzentration von 382 bzw. 383 μM auf.

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, bewirkte die Einführung zusätzlicher Mutationen auch eine Steigerung des Umsatzes von (*E*)-4-Hydroxystilben. Die Mutante I238A/G239A produzierte mit 180 μM innerhalb von 8 min die höchste Konzentration von (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben. Die anderen Mutationskombinationen führten zu geringfügig höheren Produktkonzentrationen (129-142 μM) gegenüber der Einfachmutante G239A (126 μM).

Die Einfachmutante und Mehrfachmutante mit der höchsten Aktivität gegenüber (*E*)-Stilben wurden hinsichtlich ihrer kinetischen Parameter näher untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten mit Zelllysaten wurde für diese Versuche gereinigtes P450-Enzym verwendet, damit ein gleichbleibendes Verhältnis von Redoxpartnern und P450 vorliegt. Die anwesenden natürlichen Redoxpartner im *E. coli*-Zelllysate wie z. B. Fdx und FdR würden die Vergleichbarkeit der P450-Varianten nicht gewährleisten.

Tabelle 7. K_D -Werte und kinetische Parameter von CYP154E1 Wildtyp und den Mutanten G239A und L234Q/I238V/G239A bei der Umsetzung von (*E*)-Stilben.

	Wildtyp	G239A	L234Q I238V G239A
K_M [μM]	$103,7 \pm 20$	$69,5 \pm 13$	$90,7 \pm 15$
K_{cat} [min^{-1}]	$3,9 \pm 0,2$	$15,2 \pm 0,6$	$24,6 \pm 1$
Katalytische Effizienz (K_{cat}/K_M) [$\text{min}^{-1}/\mu\text{M}$]	0,04	0,22	0,27
K_D [μM]	$0,83 \pm 0,1$	$0,48 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,04$

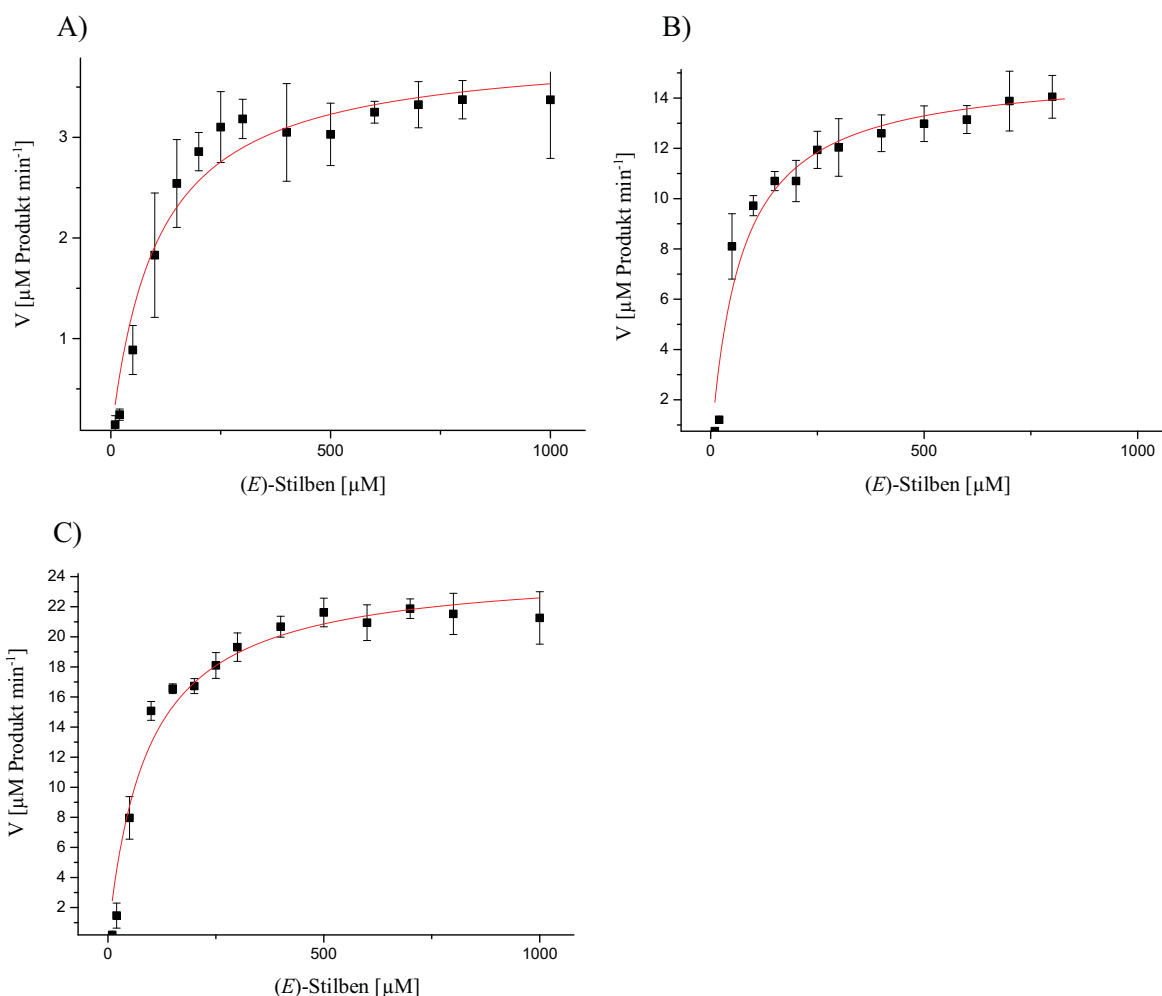


Abbildung 28. Umsatzrate in Abhängigkeit von der (*E*)-Stilbenkonzentration. Die Kurve wurde nach der Michaelis-Menten-Gleichung nicht linear mit “OriginPro 9G” (OriginLab Corporation, Northampton, USA) angepasst.

Wie in Tabelle 7 zu sehen ist, lagen die K_M -Werte in einem Bereich von 69-104 μM , wobei der Wildtyp den höchsten und die Mutante G239A den niedrigsten K_M -Wert aufwies. Der K_{cat} -Wert der Einfachmutante G239A war mit $15,2 \text{ min}^{-1}$ fast viermal so hoch wie der des Wildtyps ($3,9 \text{ min}^{-1}$). In Kombination mit dem geringeren K_M -Wert von G239A errechnet sich eine fast sechsfach höhere katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M). Mit der Einführung der Mutationen L234Q und I238V konnte der

k_{cat} -Wert weiter auf $24,6 \text{ min}^{-1}$ erhöht werden, was eine sechsfache Steigerung gegenüber dem Wildtyp entspricht. Die K_D -Werte lagen im Bereich von $0,35\text{-}0,83 \text{ }\mu\text{M}$. Die Mutationen führten zu niedrigeren K_D -Werten im Vergleich zum Wildtyp. Die Dreifachmutante L234Q/I238V/G239A wies mit 350 nM den niedrigsten Wert auf, was mehr als zweimal so niedrig wie der K_D -Wert des Wildtyps ist.

2.4.5 Aktivität der Mutanten gegenüber (*E*)-2-Hydroxystilben (1b), (*E*)-3-Hydroxystilben (1c) und Pinosylvin (1d)

Um zu untersuchen, ob die CYP154E1-Mutanten hydroxylierte Stilbenderivate als Substrate ebenfalls akzeptieren und um Stilbenoide mit unterschiedlichem Hydroxylierungsmuster herzustellen, wurde die Aktivität der Mutanten gegenüber den zuvor synthetisierten (in Kooperation mit Dragutin Antovic) oder kommerziell erworbenen Stilbenen (*E*)-2-Hydroxystilben (1b), (*E*)-3-Hydroxystilben (1c) und Pinosylvin (1d) getestet (Abbildung 29).

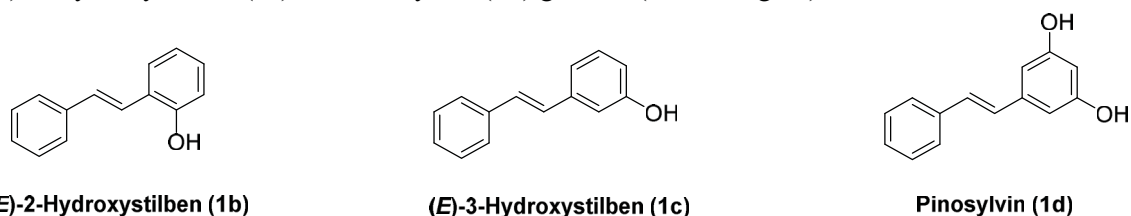


Abbildung 29. Strukturen der Substrate (*E*)-2-Hydroxystilben (1b), (*E*)-3-Hydroxystilben (1c) und Pinosylvin (1d).

Wie in der Abbildung 30 zu sehen ist, setzten alle Varianten auch die Stilbenderivate um. Den höchsten Umsatz gegenüber (*E*)-3-Hydroxystilben (1c) zeigte die Mutante L234Q/I238V/G239A (70 %). Auffällig ist der niedrigere Umsatz bei den Mehrfachmutanten I238A/G239A mit 40 % und L234Q/I238A/G239A mit 50 % gegenüber der Einfachmutante G239A (57 %).

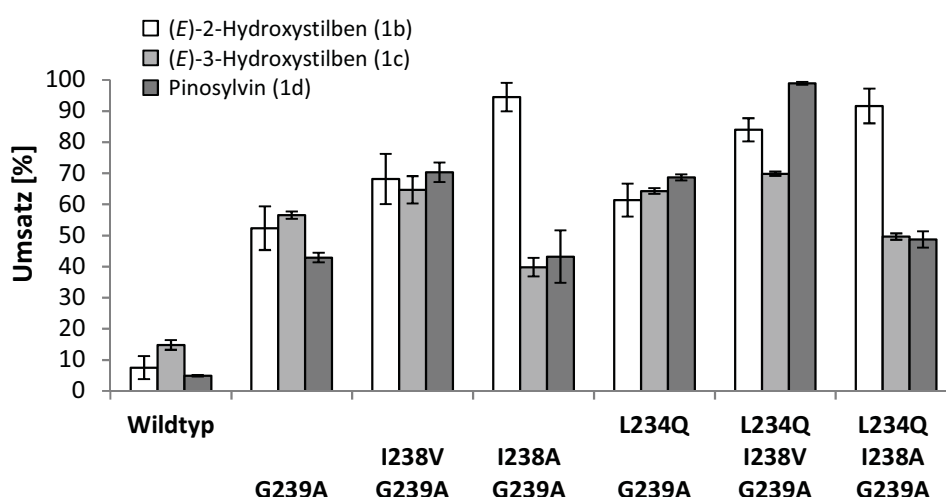


Abbildung 30. Umsetzung von $0,5 \text{ mM}$ (*E*)-2-Hydroxystilben (1b), (*E*)-3-Hydroxystilben (1c) und Pinosylvin (1c) mit CYP154E1 Wildtyp und den erstellten Mutanten. Die Inkubationszeit betrug für 1c 15 min und für 1b und 1c 30 min bei 25°C . Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unterschiedlichen Experimenten berechnet.

In der Reaktion mit (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) konnten mit den Mutanten I238A/G239A und L234Q/I238A/G239A die höchsten Umsätze erreicht werden (95 % und 92 %). Der Umsatz von (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) in der Reaktion mit den Varianten G239A, L234Q/G239A und L234Q/G239A lag in einem vergleichbaren Bereich (52-68 %). In der Reaktion mit Pinosylvin (**1c**) wurde mit der Mutante L234Q/I238V/G239A ein fast vollständiger Umsatz erreicht (99 %). Die anderen Varianten erzielten im Vergleich deutlich geringere Umsätze. Die Mutanten L234Q/G239A und L234Q/G239A setzten Pinosylvin (**1c**) zu 68-70 % um. G239A, I238A/G239A und L234Q/I238A/G239A erzielten untereinander vergleichbare Umsätze von 42-48 %. In allen Experimenten wurden mit dem Wildtyp deutlich geringere Umsätze als mit den Mutanten erreicht.

2.4.6 Umsetzungen bei höheren Substratkonzentrationen

In einem weiteren Versuch wurden Umsetzungen mit höheren Substratkonzentrationen von (*E*)-Stilben (0,5-2 mM) und (*E*)-3-Hydroxystilben (0,5-4 mM) durchgeführt (Abbildung 31). Wie in den vorherigen Experimenten wurde auch hierbei DMSO in einer Endkonzentration von 2 % als Kosolvenz zur Steigerung der Substratlöslichkeit hinzugegeben. Es ist zu erkennen, dass sich bereits bei (*E*)-Stilbenkonzentrationen von 0,5-1 mM der Umsatz verringert (Abbildung 31A). Während der Wildtyp ca. 90 % von (*E*)-Stilben bei einer Konzentration von 0,5 mM umsetzte, waren es nur noch ca. 25 % bei 1 mM. (*E*)-3-Hydroxystilben wurde zu 100 % bei einer Konzentration von 0,5 mM und 1 mM umgesetzt, während es bei einer Konzentration von 2 mM nur noch ca. 31 % waren (Abbildung 31B).

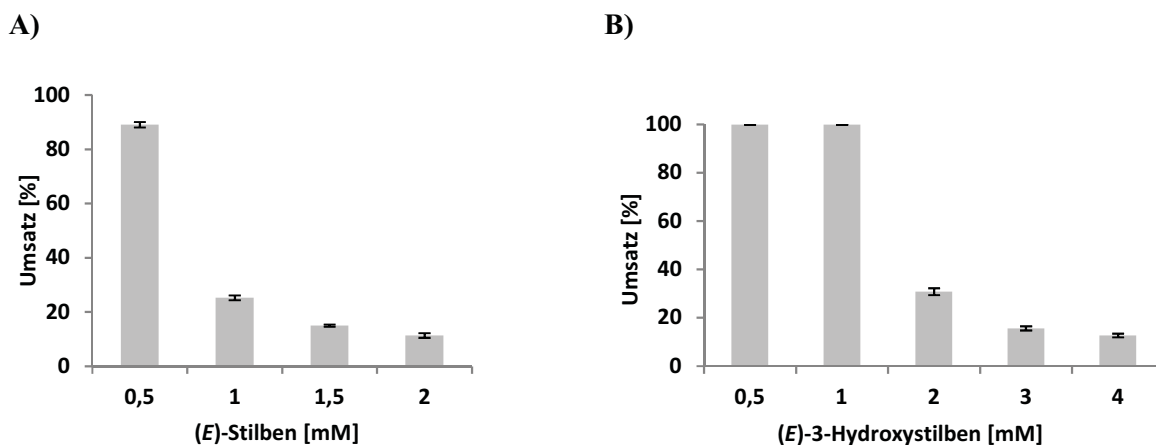


Abbildung 31. Umsatz in Abhängigkeit der Substratkonzentration. A: Umsatz von 0,5-2 mM (*E*)-Stilben mit CYP154E1 Wildtyp. B: Umsatz von 0,5-4 mM (*E*)-3-Hydroxystilben mit CYP154E1 G239A. Die Reaktionszeit betrug 17 h bei 25°C.

Die hydrophoben Stilbene besitzen eine sehr geringe Löslichkeit von wenigen mg pro Liter im wässrigen Medium. Zur Löslichkeitserhöhung wurden Versuche mit dem Lösungsvermittler Methyl- β -Cyclodextrin (**CD**) unternommen. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, die aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen bestehen.

Sie besitzen eine toroidale Struktur mit einer zentralen hydrophoben Kavität und gehören zu den sogenannten „Wirt“-Molekülen.^[144,145] Sie sind dafür bekannt, dass sie wasserlösliche Einschlussverbindungen mit hydrophoben Molekülen bilden,^[146,147] unter anderem auch mit Stilben.^[148,149] Diese Einschlussverbindungen reduzieren zudem die freie Substrat- bzw. Produktkonzentration in Lösung und verhindert dadurch mögliche inhibitorische oder toxische Effekte.^[150,151] Durch chemische Modifizierung wie z. B. Methylierung kann die Wasserlöslichkeit der nativen Cyclodextrine, vor allem die des β -Cyclodextrins, stark erhöht werden.

Zur Bestimmung eines geeigneten Verhältnisses von **CD** zu Substrat wurden Umsetzungen von (*E*)-Stilben und (*E*)-3-Hydroxystilben mit der Mutante G239A in Anwesenheit von verschiedenen **CD**-Konzentrationen (4-96 mM) durchgeführt (Abbildung 32).

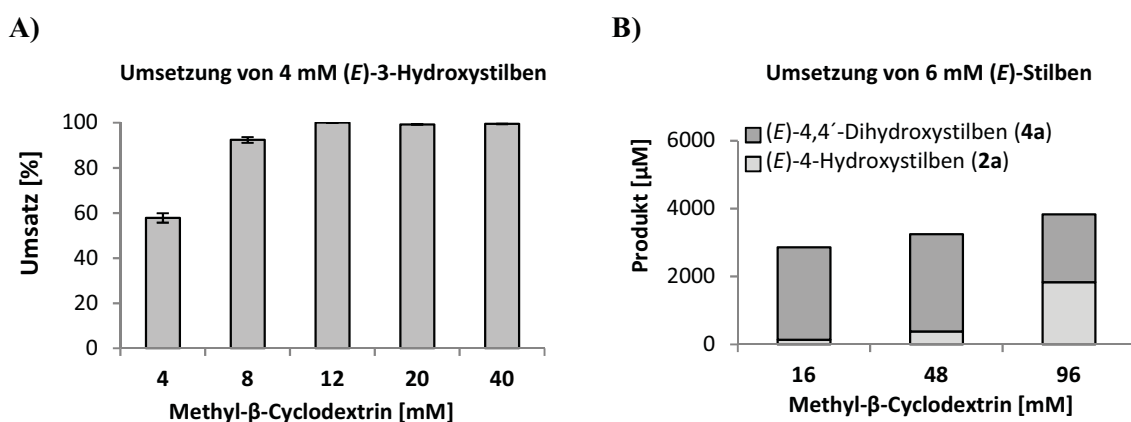


Abbildung 32. G239A-katalysierte Umsetzung von 4 mM (*E*)-3-Hydroxystilben (A) und 6 mM (*E*)-Stilben bei verschiedenen **CD**-Konzentrationen. Die Reaktionszeit betrug 17 h bei 25°C.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass in Anwesenheit von **CD** größere (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**)-Konzentrationen umgesetzt werden könnten. Bei einem **CD** zu **1c** Verhältnis von 1:1 wurden 58 % umgesetzt und steigerte sich bei höheren **CD**-Konzentrationen bis auf fast 100 %, wobei bei einem Verhältnis von 2:1 schon über 92 % umgesetzt worden sind. Die Reaktionen von (*E*)-Stilben wurden mit einem 2,6- bis 16-fachen Überschuss von **CD** durchgeführt (Abbildung 32B). Der höchste Umsatz gelang mit dem höchsten **CD**-Überschuss. Allerdings ist auch zu erkennen, dass mit hohen **CD**-Konzentrationen eine Akkumulation des Intermediates (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) stattfand. Bei einem 2,67-fachen Überschuss waren nur 141 μ M, bei einem 16-fachen Überschuss schon 1830 μ M (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) nachweisbar. Die höchsten (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**)-Konzentrationen wurden mit einem 2,67- bzw. 8-fachen Überschuss von **CD** erhalten (2718 μ M bzw. 2866 μ M).

2.4.7 Umsetzung von Stilbenen in Anwesenheit von Methyl- β -Cyclodextrin

Als nächstes wurden Versuche mit höheren Substratkonzentrationen in Anwesenheit von **CD** durchgeführt. Aus den zuvor ermittelten Daten ging hervor, dass mindestens ein zweifacher Überschuss von **CD** vorliegen sollte, um hohe Substratkonzentration (> 4 mM) umzusetzen. Die

Daten zeigen auch, dass sehr hohe Überschüsse von **CD** die Weiterreaktion möglicher Zwischenprodukte verhindern können. Daher wurden in nachfolgenden Experimenten molare Verhältnisse von 2-5:1 (**CD**: Substrat) gewählt. Es wurden Substratkonzentrationen von bis zu 20 mM eingesetzt und in Abhängigkeit vom Substrat die jeweilig aktivste CYP154E1-Mutante verwendet. Die Mutante I238A/G239A (**AA**) wurde für die Oxidation von (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) und die Mutante L234Q/I238V/G239A (**QVA**) für die Oxidation von (*E*)-Stilben (**1a**), (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) eingesetzt.

Wie in Tabelle 8 zu sehen, wurden Konzentrationen von 6 bis 12 mM (*E*)-Stilben (**1a**) (Eintrag 1-3) eingesetzt. (*E*)-Stilben (**1a**) wurde hauptsächlich zweifach in *para*-Position zu (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) hydroxyliert. Das Verhältnis zwischen dem einfach und dem zweifach hydroxylierten Produkt betrug ungefähr 1:9 (**2a:4a**). Die höchste (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**)-Konzentration (5,6 mM) wurde bei einer Startkonzentration von 12 mM (*E*)-Stilben (**1a**) beobachtet (Eintrag 3). Beim Einsatz von 5 µM der Mutante L234Q/I238V/G239A und 12 mM (*E*)-Stilben (**1a**) wurde das Substrat vollständig zu dem doppelt hydroxylierten Produkt (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) umgesetzt, was einen Produkttiter von 2,5 g/l entspricht (Eintrag 4).

Tabelle 8. Umsetzung von (*E*)-Stilben (1a**), (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**), (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) in Anwesenheit von 48 mM CD mit der jeweiligen aktivsten CYP154E1-Variante.**

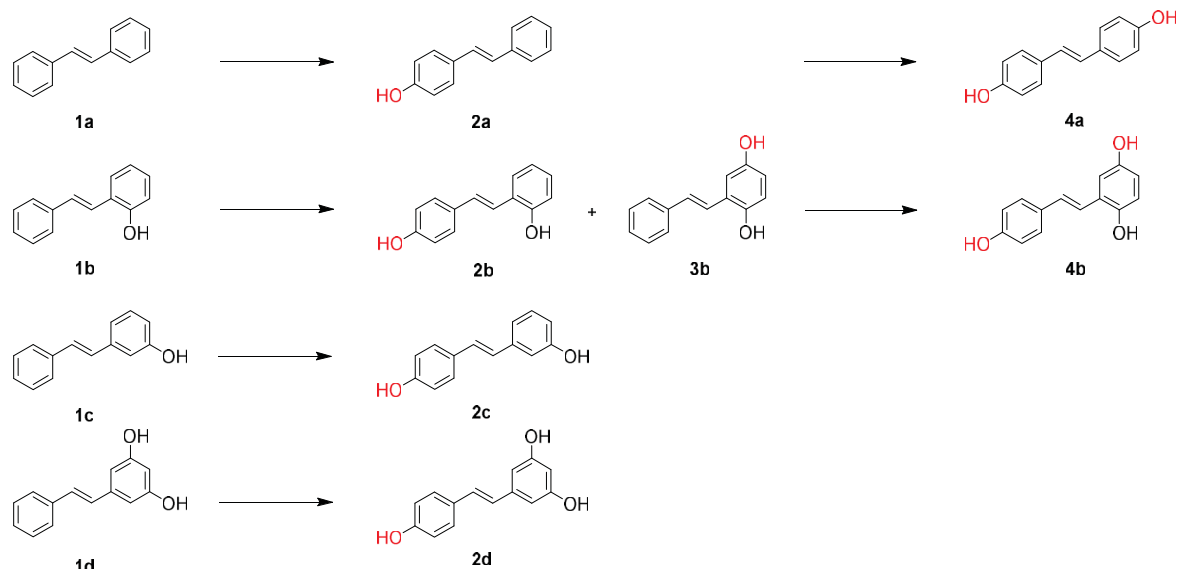
Eintrag	Substrat	Mutante	Substratkonz. [mM]	DMSO [%]	Umsatz [%]	Produktverteilung [%]						
						2a	2b	2c	2d	3b	4a	4b
1 ^a	1a	QVA	6	2	72 ± 3,2 (4,3 mM)	12					88	
2 ^a	1a	QVA	9	3	53 ± 0,4 (4,8 mM)	11					89	
3 ^a	1a	QVA	12	4	45,5 ± 2,1 (5,6 mM)	11					89	
4 ^{a,b}	1a	QVA	12	4	100 (12 mM)						100	
5 ^c	1b	AA	10	2	95 ± 2,3		88			11		1
6 ^c	1b	AA	15	3	77 ± 4,4		85			14		1
7 ^c	1b	AA	20	4	68 ± 2,7		85			15		<1
8	1c	QVA	10	2	100			100				
9	1c	QVA	15	3	100			100				
10	1c	QVA	20	4	100			100				
11	1d	QVA	10	2	80 ± 2,5				100			

Die Reaktionszeit betrug 17 h. QVA = L234Q/I238V/G239A, AA = I238A/G239A. ^aQuantifizierung wurde mit Hilfe einer zuvor gemessenen Kalibrationskurve von authentischen Proben von (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) und (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) unter Verwendung eines internen Standards durchgeführt. Die absolute Konzentration ist in Klammern angegeben. Der Umsatz und die Produktverteilung wurden aus der Summe der gebildeten Produkte von (*E*)-Stilben (**1a**) berechnet. ^b5 µM P450, 50 µM YkuN und 10 µM FdR wurden eingesetzt. ^cBerechnung des Umsatzes basiert auf der absoluten Substratkonzentration, die über eine Kalibrierung mit einem internen Standard bestimmt worden ist. ^dProduktverteilungen wurden aus den Verhältnissen der GC/MS Peakflächen von (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**), (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) und (*E*)-2,4,5-Trihydroxystilben (**4b**) bestimmt.

Bei (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**)-Konzentrationen von 10, 15 und 20 mM wurden 95 %, 77 % und 68 % umgesetzt (Eintrag 5-7), wobei aus der Produktverteilung (**2b:3b** = ca. 8,5:1,5) hervorgeht, dass der unsubstituierte Ring bevorzugt hydroxyliert wurde. Der substituierte aromatische Ring wurde im Gegensatz zum unsubstituierten Ring in der Position 5 hydroxyliert. Die Weiterreaktion

von (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**) bzw. (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) zu (*E*)-2,4'-Trihydroxystilben (**4b**) fand nur in einem geringen Ausmaß statt (1 %). (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) in der Konzentration von 10-20 mM wurde vollständig zu (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (**2c**) umgesetzt, was einen Produkttiter von 4,2 g/l entspricht (Eintrag 10).

Die Mutante L234Q/I238V/G239A katalysierte die Hydroxylierung von 10 mM Pinosylvin (**1d**) zu 80 % nach 17 h (Eintrag 11). Die Substrate (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) wurden nur am unsubstituierten aromatischen Ring in *para*-Position hydroxyliert (Schema 7).



Schema 7. Hydroxylierung der Substrate mit CYP154E1-Varianten. Die eingefügten Hydroxygruppen sind rot markiert.

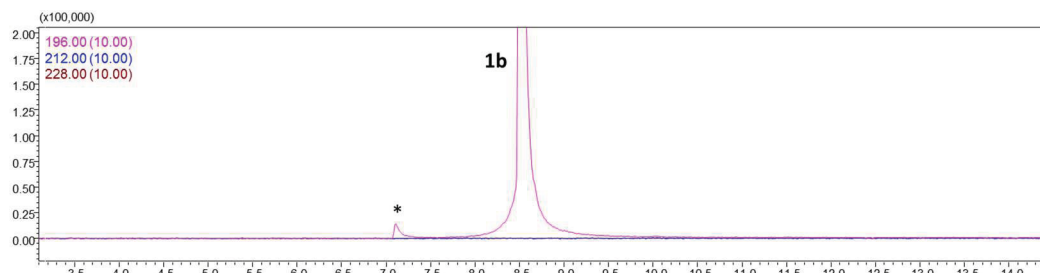
2.4.8 Identifikation der Oxidationsprodukte

Die Identifikation der Oxidationsprodukte von der Umsetzung von (*E*)-Stilben (**1a**) erfolgte mittels GC/MS-Analyse durch Vergleich mit kommerziell erworbenen (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) oder mit dem zuvor synthetisierten (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) (siehe Kapitel 5.3.12). Diese Verbindungen wurden ebenfalls zur Produktquantifizierung von (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) und (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) verwendet.

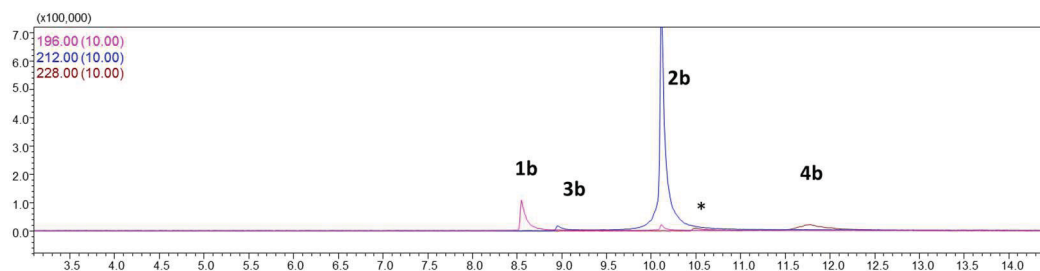
Für die Identifikation der Oxidationsprodukte von (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**), (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) wurden die Reaktionen in einem präparativen Maßstab durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend aufgereinigt und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert. Es wurden Substratkonzentrationen von 1-10 mM in einem Volumen von 10 ml eingesetzt. Ein vollständiger Umsatz der Substrate (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**), (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) wurde innerhalb von 22 h erreicht. Um die zweifache Hydroxylierung von (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) zu ermöglichen, wurde kein **CD** hinzugefügt. Die Produkte (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**), (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**), (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (**2c**) und Resveratrol (**2d**) wurden mittels Kieselgelsäule aufgereinigt und ergaben isolierte Ausbeuten von 79 %, 75 %, 87 % bzw. 83 %. Das Produkt (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) wurde nicht isoliert, da die Identifikation über den Reaktionsverlauf mittels GC/MS-Analyse möglich war. Wie in dem

extrahierten Ionenchromatogramm (EIC) zu sehen ist, bildet sich innerhalb von 30 min aus dem Substrat (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) ($m/z = 196$) das Produkt (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**) und zu kleinen Teilen (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) mit einer Massendifferenz von +16 (Abbildung 33A+B). Diese Massendifferenz entspricht dem Atomgewicht von Sauerstoff und deutet auf eine Hydroxylierung hin.

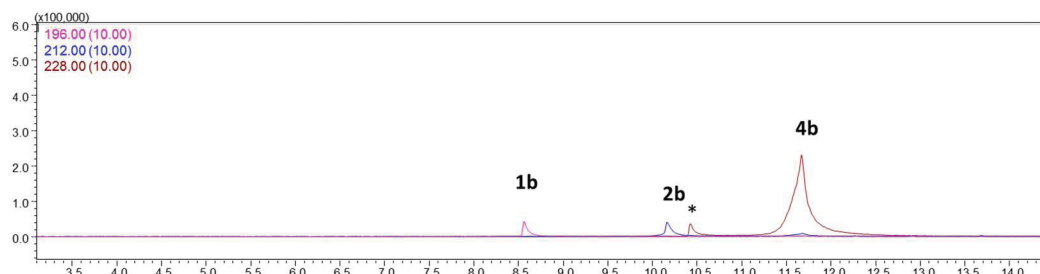
A: $t = 0$ min, Umsatz von 0,5 mM (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**)



B: $t = 30$ min, Umsatz von 0,5 mM (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**)



C: $t = 80$ min, Umsatz von 0,5 mM (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**)



D: $t = 17$ h, Umsatz von 10 mM (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) in Anwesenheit von 48 mM CD

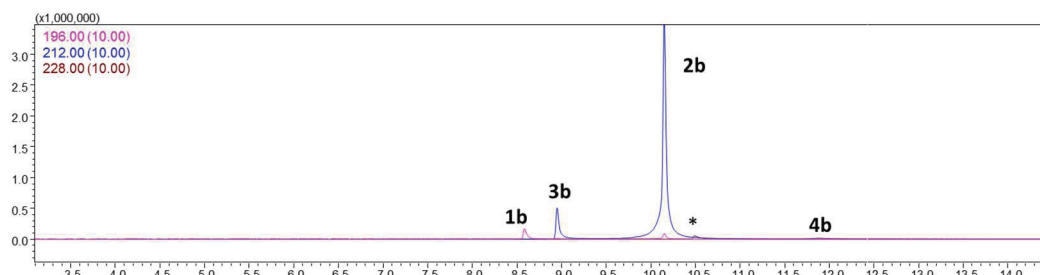
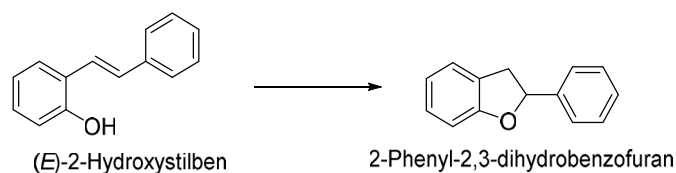


Abbildung 33. Extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) der Umsetzung von (*E*)-2-Hydroxystilben (1b**) zu verschiedenen Zeitpunkten.** Die Molekülionen (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) ($m/z = 196$), (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) ($m/z = 228$), (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**) und (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) ($m/z = 212$) wurden zur besseren Visualisierung ausgewählt. Der Stern markiert Verunreinigungen.

Abbildung 33C zeigt das Chromatogramm der Reaktion nach 80 min. (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) und größtenteils auch (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**) sind zu (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) mit einer Massendifferenz von +16 weiterreagiert, was einer zweiten Hydroxylierung entspricht. Abbildung 33D zeigt das Chromatogramm der Reaktion in Anwesenheit von **CD**. Die Weiterreaktion von (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**) und (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) zu (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) wurde unterdrückt.

Die Verunreinigung mit $m/z = 196$ (Abbildung 33A) entstand vermutlich durch eine intramolekulare Addition der Hydroxygruppe in *ortho*-Position an die Doppelbindung von (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) zum 2-Phenyl-2,3-dihydrobenzofuran (Schema 8).^[152] 2-Phenyl-2,3-dihydrobenzofuran wurde anschließend wahrscheinlich zweifach hydroxyliert, was zu der Verunreinigung mit $m/z = 228$ führte (Abbildung 33C).



Schema 8. Angenommene Entstehung der Verunreinigung in der Reaktionsmischung nach der Hydroxylierung von (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**).

3 Diskussion

3.1 Deorphanisierung von CYP154F1 und Untersuchungen zur Struktur-Funktions-Beziehung

Für die Entwicklung neuer biokatalytischer Prozesse, in welchen Cytochrom-P450-Monooxygenasen involviert sind, werden neue P450-Enzyme mit interessanten Eigenschaften benötigt. Hierzu stehen über 52.000 P450-Gene aus Genomsequenzierungsprojekten zur Verfügung.^[3] Allerdings sind nur ein Bruchteil dieser P450-Enzyme bezüglich ihrer Funktion und des Substratspektrums charakterisiert. Die unbekannten P450 ohne funktionelle Zuordnung werden auch als „*orphan P450*“ bezeichnet. Um den P450-Genpool in der Biokatalyse nutzen zu können, ist eine vorherige Entschlüsselung der Funktionen (*deorphanization*) notwendig. Für diese arbeitsintensive Aufgabe wurden verschiedene Methoden vorgestellt (siehe Einleitung, Kapitel 1.1.6).^[58] So ist es zum Beispiel möglich anhand der Aminosäuresequenz-Identität, die sich in der Familienzugehörigkeit widerspiegelt, eine grobe Vorauswahl zu treffen.^[59] Aus der CYP154-Familie wurden bereits drei 3D-Strukturen gelöst und sieben Enzyme charakterisiert. Diese Familie zeichnet sich durch ihr breites Substratspektrum und ihre Substratpromiskuität (CYP154E1 und CYP154A8) aus (siehe Einleitung, Kapitel 1.1.7). Daher ist diese P450-Familie ein wertvoller Genpool mit einer überschaubaren Anzahl von P450-Sequenzen. Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Studie das Substratspektrum eines unbekannten Mitglieds der Familie CYP154 bestimmt und mit dem einer bereits charakterisierten CYP154 verglichen werden. Für dieses Vorgehen wurde CYP154F1 gewählt, da dieses Enzym der nächste Verwandte von CYP154E1 ist, welches ein vielfältiges Substratspektrum und eine hohe Aktivität aufweist.^[73] Aufgrund der relativ hohen Aminosäuresequenz-Identität von ca. 50 % wurden ähnlich interessante Eigenschaften von CYP154F1 erwartet. Ferner sollten die molekularen Determinanten für die Unterschiede im Substratspektrum identifiziert werden.

3.1.1 Klonierung und Expression von CYP154F1

Die zwei sich um eine Länge von 162 Aminosäuren unterscheidenden Annotierungen des Gens *cyp154f1* konnten beide in *E. coli* exprimiert werden. Die kurze Version (CYP154F1_s.v.) zeigte allerdings ein Absorptionsmaximum bei 420 nm im CO-Differenzspektrum. Dieses Absorptionsmaximum ist bei inaktiven P450-Enzymen vorzufinden. Es wird angenommen, dass diese Absorption durch eine veränderte Häm-Koordination hervorgerufen wird (Protonierung des Cystein-Thiolat-Liganden zum Thiol und/oder Ligation durch umliegendes Histidin).^[131,132,153] Die längere Version (CYP154F1_l.v.) wies bei 450 nm sein Absorptionsmaximum auf, war jedoch nicht stabil und präzipitierte. Das Protein konnte teilweise resuspendiert werden und wies weiterhin die für P450 charakteristische Absorption bei 450 nm auf. Eine Analyse mittels SDS-PAGE zeigte für das resuspendierte Protein eine definierte Bande, die von der Laufstrecke zwischen der kurzen und langen Version von CYP154F1 lag. Die Annahme war, dass dieses trunkierte Protein die natürlich vorkommende Variante von CYP154F1 ist. Die genaue Größenbestimmung gelang mit der Massenspektroskopie (ESI-TOF-MS). Eine anschließende Untersuchung der Sequenz auf

DNA-Ebene zeigte, dass an der Bruchstelle ein Startcodon vorliegt. Ebenfalls war eine potentielle ribosomale Bindungsstelle stromaufwärts des Startcodons vorzufinden. Die Klonierung und Expression führte zu einem aktiven und stabilen Protein, welches CYP154F1_s.v. in einer Länge von 30 Aminosäuren N-terminal übersteigt.

Es lässt sich annehmen, dass die beiden publizierten Annotierungen von *cyp154f1* in ihrer Sequenzlänge nicht korrekt sind. Die Denaturierung der langen Version könnte durch eine unzureichende Wechselwirkung des N-terminus mit dem Protein und die dadurch resultierende erhöhte Flexibilität hervorgerufen worden sein, was letztendlich zur Trunkierung führte.

Ein Sequenzalignment mit den bereits charakterisierten CYP154-Mitgliedern zeigt, dass CYP154F1_s.v. einen um ca. 30-40 Aminosäuren kürzeren N-terminus besitzt (Abbildung 34). Dieser Vergleich spricht ebenfalls für eine falsche Annotierung von CYP154F1_s.v. Die fehlende Region ist anscheinend wichtig für die korrekte Koordination des Häms und führt bei CYP154F1_s.v. zu dem beobachteten Absorptionsmaximum von 420 nm im CO-Differenzspektrum.

```

CYP154F1_s.v.      -----MVVE-GLEVWALTHDRE
CYP154F1          MA-----AVPEPIVLVPG---KSREQALQLREAGPLARVVVE-GLEVWALTHDRE
CYP154E1_tfu      MG-----QSRPHTVYLDPAKGVDIPAQRRELLDKGPVVRVAFPGNLEVWALTHDAP
CYP154H1_tfu      MM-----ASPTDNPIVLDPY-VSDLEGERERLYEAGPIAWVELPGGVRTWSVTHHQA
CYP154C1_sc       MT-----TGTEEARIPLDPF-VTDLDGESARLRAAGPLAAVELPGGVVWAVTHHAE
CYP154C3_sgri     MNCPTHAAQTDPGAGTVVIDPM-VQDLGGETARLRDAGVLARIDLL-GVPAWTVTRHAE
CYP154C5_Nf       MN-----ACPHSDTLTIDPM-ITDLAGETSRLRAAGPLTRIDLL-GVPALAVTGHTL
CYP154A1_sc       MA-----TQQPALVLDPT-GADHHTTEHRTLREGGPATWVDVL-GVQAWSVSDPVL
CYP154A8_Nf       ME-----STQMPLVLDPPI-GADIQGESERLRARGPVTSVEMPGGVRAWSVTDPAL

```

Abbildung 34. Proteinsequenzalignment der N-terminalen Region von CYP154F1, CYP154E1 und CYP154H1 aus *T. fusca* YX, CYP154A1 und CYP154C1 aus *S. coelicolor*, CYP154A8 und CYP154C5 aus *N. farcinica* und CYP154C3 aus *S. griseus*. Das Sequenzalignment wurde mit MAFFT (v7.273) durchgeführt. AS = Aminosäure.

3.1.2 Kristallisation von CYP154F1

Die Kristallisation von CYP154F1 wurde in Kooperation mit der „Crystal and X-Ray Facility“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Im initialen Screening mit über 3500 verschiedenen Kristallisationsbedingungen nach der Dampfdiffusionsmethode (*sitting drop*) konnten verwachsene Kristalle von CYP154F1 identifiziert werden. Kristalle bildeten sich nur bei einer CYP154F1-Variante, bei der zuvor der N-terminale His-Tag mit Hilfe von Thrombin entfernt wurde. Ebenso scheint die Zugabe des Liganden Geraniol notwendig zu sein, da nur in den Co-Kristallisationsexperimenten Kristalle entdeckt wurden. Eine Bindung von einem Substrat führt bei Cytochrom-P450-Monooxygenasen zu einer Änderung von der offenen zur geschlossenen Konformation.^[154] Die geschlossene Konformation ist enger gepackt und weniger flexibel, wodurch die Kristallisation von Proteinen gefördert werden kann.^[155]

Im *fine screening* wurden die Bedingungen weiter angepasst und in einem größeren Maßstab durchgeführt. Dadurch konnten größere und weniger verwachsene Kristalle gezüchtet werden. Im Additiv-Screening wurden verschiedene Reagenzien zugegeben. Diese können die Löslichkeit des Proteins verändern oder Konformationen des Proteins stabilisieren und so die Qualität oder die Größe der Kristalle verbessern.^[156–158] Bei der Kristallisation von CYP154F1 zeigte sich, dass die Zugabe von Betain zu einem Einkristall führt. Die Struktur konnte in einer Auflösung von 3 Å gelöst

werden - allerdings aufgrund von Strahlenschäden nur zu 80 %. Ein Grund für diese Strahlenschäden könnte das trikline Kristallsystem mit der Raumgruppe P1 sein, in dem das Protein auskristallisiert ist. Die Raumgruppe P1 besitzt keine Symmetrie, weshalb für einen vollständigen Datensatz der Kristall über eine 360°-Drehung vermessen werden musste. Dadurch erhöht sich die Gesamtdosis der Röntgenstrahlung, was zu Strahlenschäden führen kann. Nach erneuten Kristallisationsversuchen konnte ein weiterer Kristall gezüchtet werden, mit dem die Struktur von CYP154F1 nahezu vollständig mit einer Auflösung von 2,6 Å gelöst werden konnte.

Kristallstruktur von CYP154F1

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, war die Zugabe von Geraniol als Ligand für die Kristallisation notwendig. Allerdings konnte dieses Substrat nicht in der Struktur identifiziert werden. In vielen P450-Enzymen findet eine Änderung zur geschlossenen Konformation bei Substratbindung statt.^[159,160] Hierbei bewegen sich die F- und G-Helices in Richtung des Häms und schließen bzw. verengen den Substrateingangskanal.^[161] Die Querschnitte der Substrateingangs- tasche von CYP154F1 zeigen einen engen Substrateingangskanal (Kapitel 2.2.3, Abbildung 18). Dieser misst einen Durchmesser von unter 5 Å, was eher für die geschlossene Konformation spricht, da ansonsten die etwas größeren Substrate ((*E*)-Stilben und (+)-Nootkaton) Schwierigkeiten hätten, das aktive Zentrum zu erreichen.

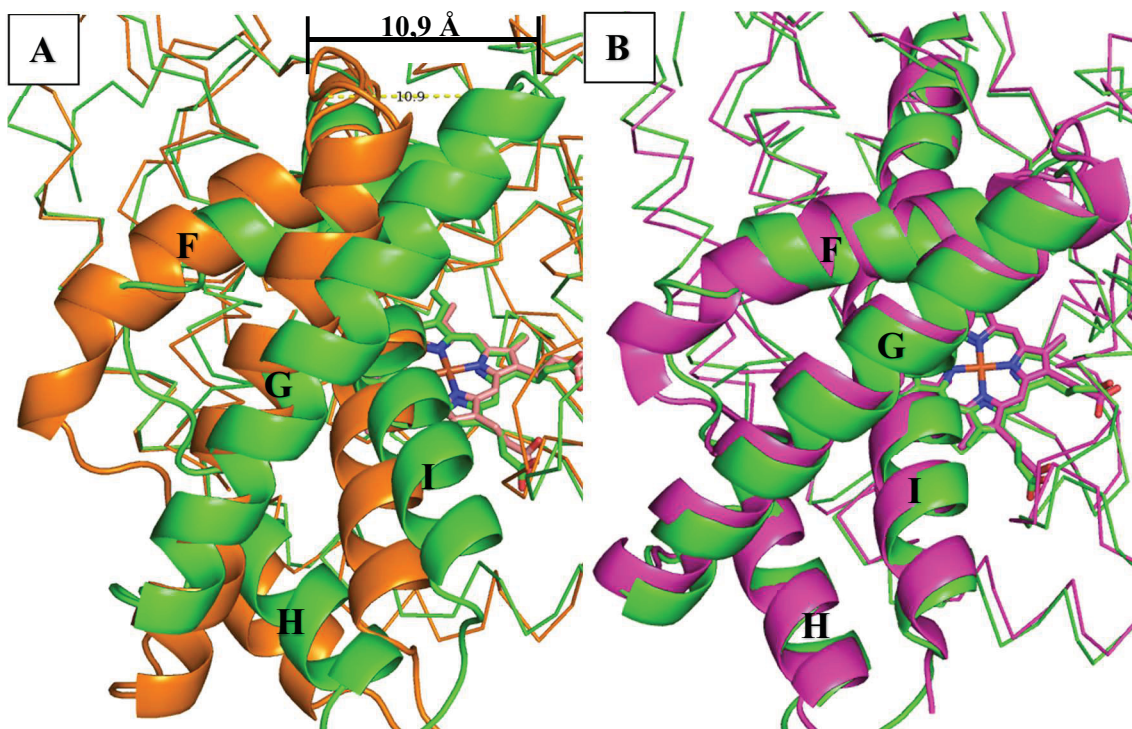


Abbildung 35. Superposition der CYP154F1-Struktur mit Strukturen aus der gleichen Familie. A) mit CYP154C1 in der offenen Konformation (1GWI). B) mit CYP154A1 in der geschlossenen Konformation (1ODO). CYP154F1 ist in Grün, CYP154C1 in Orange und CYP154A1 in Magenta gefärbt. Die F-, G-, H- und I-Helix sind als *Cartoon* dargestellt. Zur Visualisierung wurde PyMOL 0.99rc6 verwendet.

Die Abbildung 35A zeigt die Superposition von CYP154F1 und CYP154C1 (1GWI). 1GWI ist ohne Substrat in der offenen Konformation kristallisiert.^[75] Die Überlagerung dieser zwei Strukturen zeigt deutliche Abweichungen der F-, G-, H- und I-Helices. Die FG-Schleife ist um 10,9 Å versetzt, während in Abbildung 35B die FG-Schleife des Strukturalignment von CYP154F1 und CYP154A1 fast deckungsgleich ist. CYP154A1 (1ODO) wurde mit einem Liganden co-kristallisiert und liegt in der geschlossenen Konformation vor. Die Daten sprechen eher dafür, dass CYP154F1 auch in dieser Konformation kristallisiert wurde. Möglicherweise ist CYP154F1 mit Geraniol in der geschlossenen Konformation kristallisiert und das Geraniol hat sich im Nachhinein verflüchtigt. Die relativ niedrige Affinität von Geraniol zu CYP154F1 (K_M -Wert = 426 µM) spricht ebenfalls für diese Annahme.

Die Form der Substratbindetasche von CYP154F1 (siehe Kapitel 2.2.3, Abbildung 18) ist geprägt durch Ausbuchtungen und besitzt einen fließenden Übergang mit dem Substrateingangskanal. Allerdings sei hier anzumerken, dass sowohl die Form als auch die Größe der Substratbindetasche in Kristallstrukturen von P450 unterschiedlich in Erscheinung treten kann. Wie oben erwähnt, geht eine Konformationsänderung mit der Substratbindung einher und die Substratbindetasche passt sich dem jeweiligen Substrat zum Teil an.^[32,162–164] Weiterhin auffällig ist das polare Zentrum, hervorgerufen durch die polare Aminosäure Threonin in Position 234, welche inmitten der I-Helix in der Nähe zum Hämeisen lokalisiert ist. Im Allgemeinen sind die Substrate von P450-Monooxygenasen eher hydrophob, weshalb das aktive Zentrum vorrangig mit hydrophoben Aminosäuren ausgestattet ist. Die strukturelle Übereinstimmung mit anderen 3D-Strukturen kann durch den RMSD-Wert nach einem Strukturalignment angegeben werden. Die RMSD-Werte von 1,13-1,39 Å mit den bereits bekannten Strukturen aus der Familie CYP154 zeigen die hohe strukturelle Konservierung innerhalb der Familie an. Die höchste strukturelle Übereinstimmung hat demnach CYP154F1 mit der Struktur von CYP154A1 (1ODO), obwohl sie eine niedrige Aminosäuresequenz-Identität von ca. 41 % zueinander haben. Der höhere RMSD-Wert mit CYP154C1 (1GWI) trotz hoher Aminosäuresequenz-Identität von 45 % spricht ebenfalls für die unterschiedliche Konformation (Abbildung 35A).

Vergleich von Homologiemodell und Kristallstruktur

Der RMSD-Wert der C-alpha Atome des Homologiemodells von CYP154F1 mit 1ODO als Template und der Kristallstruktur von CYP154F1 beträgt 1,128 Å. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass bei einem Wert von unter 2 Å die Strukturen eine hohe Ähnlichkeit aufweisen, da selbst bei zwei Kristallstrukturen des gleichen Proteins Abweichungen von bis zu 0,5 Å vorliegen können.^[165] Zwei mit der Röntgenstrukturanalyse bestimmte Proteine mit einer Sequenzidentität von 50 % haben durchschnittlich einen RMSD-Wert von 1 Å.^[141] Des Weiteren besitzen die ausgewählten elf Aminosäuren im aktiven Zentrum der Kristallstruktur und des Homologiemodells einen noch niedrigeren RMSD-Wert von 0,916 Å. Unter diesen Gesichtspunkten kann das erstellte Homologiemodell daher als erfolgreich betrachtet werden.

Häm-Koordination

Das Häm in der Kristallstruktur von CYP154F1 nimmt eine andere Orientierung ein als in den meisten P450-Enzymen. Das Häm in CYP154F1 ist um 180° gedreht, was dazu führt, dass die beiden Vinylreste zueinander vertauscht sind (siehe Kapitel 2.2.3, Abbildung 19). Bislang wurde solch eine Anordnung nur in CYP154A1 und CYP121 beschrieben, wobei für CYP121 eine Mischung aus den beiden Orientierungen vorlag.^[74,138] Mischungen unterschiedlicher Häm-Konformationen wurden unter anderem für Cytochrom b5 beschrieben.^[166–168] Hierbei zeigte sich, dass die Anordnung zu leicht unterschiedlichen Redoxpotentialen führt, was allerdings keine Auswirkungen auf die Funktion hatte.^[74,169] Ob eine unterschiedliche Orientierung des Häms in P450-Enzymen eine funktionelle Relevanz hat, ist unklar. Weiterhin konnten für CYP154A1 und CYP121 keine strukturellen Gründe für das um 180° gedrehte Häm gefunden werden.^[74] Bei Analyse der Aminosäuren in der Umgebung des Häms in CYP154F1 fällt nur auf, dass sich, im Gegensatz zu den meisten anderen P450, anstelle des konservierten Arginins im β -Faltblatt β -2 ein Leucin befindet (Leu288). Leucin kann keine Salzbrücke mit der Carboxygruppe vom Protoporphyrin ausbilden. Allerdings trägt CYP154F1 in der Position 58 einen Argininrest, der die Bindung übernehmen kann (siehe Kapitel 2.2.3, Abbildung 19). Dieser Unterschied führt aber wahrscheinlich nicht zu der unterschiedlichen Häm-Konformation, da CYP154A1 und CYP121 das konservierte Arginin im β -Faltblatt β -2 besitzen (Arg295 bzw. Arg286). Weiterhin lieferte die Analyse der Aminosäuren in der Umgebung des Häms keine Gründe für diese Drehung in CYP154A1 und CYP121.

3.1.3 Cluster-Screening und Vergleich der Substratspektren von CYP154F1 und CYP154E1

In dieser Arbeit wurde die von von Bühler *et al.* etablierte Methode (Cluster-Screening) zur Deorphanisierung von CYP154F1 angewandt. Da die Substratspektren von CYP154F1 und CYP154E1 verglichen werden sollten, wurden möglichst die gleichen potentiellen Substrate getestet. Darüber hinaus wurden ca. 50 weitere organische Verbindungen getestet. Diese setzten sich vorrangig aus aromatischen Verbindungen zusammen, die so oder in abgewandelter Form als Baustein im Lignin vorkommen. Die Auswahl wurde getroffen, da die Enzyme CYP154F1 und CYP154E1 aus *T. fusca* YX stammen. Dieses Actinobakterium ist in selbsterwärmenden organischen Stoffen wie z. B. in Komposthaufen vorzufinden und ist dafür bekannt, Pflanzenzellwände abzubauen.^[170,171] Des Weiteren beinhaltet das Genom Laccasen und Peroxidasen, die Aktivität gegenüber Lignin zeigen.^[172,173] Daher bestand die Annahme, dass die im Genom enthaltenen Cytochrom-P450-Monooxygenasen für den Katabolismus der Ligninbausteine zuständig sein könnten und diese daher als Substrat akzeptieren.

Insgesamt wurden 12 der 100 getesteten organischen Verbindungen als Substrate von CYP154F1 akzeptiert (siehe Tabelle 9, vollständige Liste aller getesteten Verbindungen siehe Anhang Tabelle 19). Von den getesteten Fettsäuren mit der Kettenlänge C₄-C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ und C₁₈ wurden nur Octansäure und Decansäure zu einem geringen Ausmaß umgesetzt. CYP154E1 setzte hingegen Fettsäuren mit der Kettenlänge C₇-C₁₂ und C₁₄ um, wobei kurzkettigere Fettsäuren als Heptansäure

nicht getestet worden sind. Die Tendenz des Umsatzes sinkt allerdings ab einer Kettenlänge von C₈ (Octansäure) und liegt bei Heptansäure nur noch bei 29 %, so dass davon ausgegangen werden kann, dass CYP154E1 keine kurzkettigen Fettsäuren umsetzt.^[73] CYP154E1 hydroxylierte die Fettsäure vorrangig an der ω -1 Position und zu einem geringen Ausmaß an der ω -2 Position. Für CYP154F1 wurde in dieser Studie nur eine ω -1-Hydroxylierung beobachtet.

Tabelle 9. Vergleich der akzeptierten Substrate von CYP154E1 und CYP154F1. Die Substrate von CYP154E1 wurden im Cluster-Screening von von Bühler *et al.* identifiziert.^[73] ^aSubstrat für CYP154E1 wurde im Rahmen dieser Studie identifiziert. ^bSubstrat wurde von CYP154F1 umgesetzt und mit CYP154E1 nicht getestet. Nerolaceton, Geraniolaceton und Undecansäure wurden im Rahmen dieser Studie nicht mit CYP154F1 getestet.

CYP154E1			CYP154E1/F1
Heptansäure	Thioanisol	Geraniolaceton	Octansäure
Nonansäure	(1S)-(-)-Verbenon	Nerolaceton	Decansäure
Undecansäure	(E)-Stilben ^a	Farnesol	2,4,6-Trimethyloctanol
Dodecansäure	(E)-4-Methoxystilben ^a	Farnesylaceton	1-Octanol
Tetradecansäure	(E)-4-Hydroxystilben ^a	(+)-Nootkaton	2-Octanol
2,4,6-Trimethyloctansäure	(E)-3-Hydroxystilben ^a	Nootkatol	3-Octanol
2,4,6-Trimethyloctansäure-Methylester	(E)-2-Hydroxystilben ^a	Grundmanns Keton	2-Nonanol ^b
2,4,6,8-Tetramethyl-Decansäure	Pinosylvin ^a	n-Butylmethylthioether	γ -Nonalacton ^b
2,4,6,8-Tetramethyl-Decanol	Pergolid	Benzylmethylthioether	Geraniol
1-Decanol	α -Pinen	Campher	Nerol
1-Octanthiol			α -Ionon ^a
			β -Ionon ^a

Von den Alkoholen setzte CYP154F1 die 1-, 2-, und 3-Octanole und 2-Nonanol um, während CYP154E1 zusätzlich 1-Decanol akzeptierte. Von den azyklischen Terpenen setzte CYP154F1 nur Geraniol und Nerol um, wobei hier eine deutliche Präferenz für Geraniol vorlag (87 % vs. 4 % Umsatz). Die Unterscheidung dieser *E/Z* Isomere ist für CYP154E1 weniger stark ausgeprägt. Bogazkaya *et al.* berichteten von einem leicht höheren Umsatz von Geraniol gegenüber Nerol (98 % und 77 %).^[81] CYP154F1 hydroxylierte genau wie CYP154E1 Geraniol und Nerol terminal in der Allylposition zu (*E*)-8-Hydroxygeraniol und (*Z*)-8-Hydroxynерol. Das langkettigere Farnesol und Farnesylaceton (C₁₂) wurden nur durch CYP154E1 umgesetzt.

Durch die Verwendung dieser Alkohole und Fettsäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge lassen sich erste Aussagen über die Größe der Substratbindetasche treffen. So ist zu erkennen, dass CYP154F1 Verbindungen mit einer Kettenlänge von C₈-C₁₀ als Substrat akzeptiert, während CYP154E1 azyklische Substrate mit kürzeren und längeren Kettenlängen in einem Bereich von C₇-C₁₄ akzeptiert. CYP154E1 akzeptierte alle getesteten sterisch anspruchsvollen verzweigten Alkohole und Fettsäuren/Ester, während CYP154F1 nur 2,4,6-Trimethyloctanol umgesetzt hat. Die zyklischen Terpene α - und β -Ionon wurden von beiden Enzymen umgesetzt. γ -Nonalacton wurde ebenfalls von CYP154F1 umgesetzt. Auffallend ist hier, dass auch diese drei zyklischen Verbindungen von der Größe und dem Molekulargewicht in einem ähnlichen Bereich wie die

geradkettigen akzeptierten Verbindungen liegen. CYP154E1 hingegen akzeptierte zusätzlich weitaus größere Substrate wie z. B. das Mutterkornalkaloid Pergolid, Grundmanns Keton oder (+)-Nootkaton. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Studie die getesteten Stilbene von CYP154E1 am aromatischen Ring hydroxyliert (siehe Kapitel 2.4). CYP154F1 akzeptierte keines der getesteten aromatischen Verbindungen oder Lignin-Bestandteile als Substrat. Auch kleinere zyklische Monoterpene wie α -Pinen oder (1S)-(-)-Verbenon wurden ausschließlich von CYP154E1 akzeptiert.

Trotz der relativ hohen Aminosäuresequenz-Identität von 50 % zeigt der Vergleich der Substratspektren von CYP154E1 und CYP154F1, dass CYP154E1 deutlich promiskuitiver ist. CYP154E1 akzeptierte sowohl größere als auch kleinere Substrate im Vergleich zu CYP154F1. Zudem deuten die beschriebenen Umsätze von von Bühler *et al.* auf eine höhere Aktivität von CYP154E1 gegenüber allen von CYP154F1 akzeptierten Substraten hin. Das ebenfalls von von Bühler *et al.* im Cluster-Screening charakterisierte CYP154A8 zeigte, ungeachtet der geringeren Aminosäuresequenz-Identität von 40 %, eine weitaus größere Überlappung des Substratspektrums. CYP154A8 akzeptierte 23 und CYP154E1 33 der 51 getesteten Substrate. CYP154A8 zeigte sich im Allgemeinen selektiver und weniger aktiv als CYP154E1.^[73]

3.1.4 Mutagenese-Studien zu CYP154F1

Als nächstes sollte auf molekularer Ebene untersucht werden, weshalb CYP154F1 im Gegensatz zu CYP154E1 trotz einer relativ hohen Aminosäuresequenz-Identität ein enges Substratspektrum besitzt. Da zu diesem Zeitpunkt keine Kristallstrukturen verfügbar waren, wurden Homologiemodelle erstellt und die Strukturen miteinander verglichen. Der Fokus lag hierbei auf den Substratbindetaschen, da die Annahme war, dass deren Aminosäurekonstitution maßgeblich für die Substratwahl und Aktivität der P450-Monooxygenase verantwortlich ist.

Elf Positionen in CYP154F1 und CYP154E1, die für die Architektur der Substratbindetasche verantwortlich sind, wurden dazu näher betrachtet. Sieben dieser Positionen sind in beiden Enzymen mit den identischen Aminosäuren besetzt. Unterschiede gibt es vor allem in der SRS4, die sich mitten in der I-Helix befindet, und auf der SRS2 im Bereich der FG-Schleife. Um zu untersuchen, ob diese Unterschiede in der Substratbindetasche für das unterschiedliche Substratspektrum verantwortlich sind, wurden diese vier Positionen von CYP154F1 so mutiert, dass sie denen von CYP154E1 entsprechen. Dazu wurden die vier Einfachmutanten F172L, W230L, T234I, A235G und eine Mutante, die alle vier Mutationen trägt, erstellt. Zur Untersuchung der CYP154F1-Mutanten wurde eine kleine Auswahl an Modells substraten gewählt. (+)-Nootkaton, Dodecansäure, (E)-Stilben werden nur von CYP154E1 akzeptiert und sollten den Einfluss der Mutation auf das Substratspektrum verdeutlichen. Geraniol wird von beiden Enzymen umgesetzt und kann daher Informationen über die Aktivität der Mutanten liefern.

(E)-Stilben und Dodecansäure wurden von keiner dieser Mutanten umgesetzt. Die Mutationen F172L und W230L verringerten die Aktivität gegenüber Geraniol. Eine mögliche Erklärung für die verringerte Aktivität wäre, dass die raumschaffenden Mutationen F172L und W230L die Flexibilität

des Substrats Geraniol innerhalb der nun vergrößerten Substratbindetasche erhöhen und somit eine Oxidation erschweren.

Die Vierfachmutante zeigte keine Aktivität gegenüber den Substraten. Der Austausch von A235G scheint dafür mitverantwortlich zu sein, da die alleinige Mutation ebenfalls zu einem vollständigen Aktivitätsverlust gegenüber Geraniol führte. In P450-Enzymen ist die korrespondierende Position stark konserviert. Zu ca. 75 % liegt hier ein Alanin vor und zu 14-18 % ein Glycin.^[30] Interessanterweise führte bei CYP154E1 die Mutation an dieser Position zum Alanin (G239A) zu einer drastischen Steigerung der Aktivität gegenüber Stilbenen (siehe Kapitel 2.4). Die Substitution an der korrespondierenden Position in P450cam zu Alanin (G248A) führte ebenfalls zu einer verbesserten Aktivität und Kopplungseffizienz gegenüber Ethan.^[174] Diese Position scheint sehr sensitiv hinsichtlich Mutationen zu sein, so dass kleine Veränderungen zu Unterschieden in der Aktivität führen. Studien zu P450cam und P450-BM3 zeigten, dass das Carbonylsauerstoffatom des Gly248 bzw. Ala264 an der Fixierung des Wassermoleküls, welches am nächsten dem Hämeisen angeordnet ist, über eine Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist.^[175,176] Dieses Wassermolekül ist für die Protonenübertragung während des katalytischen Zyklus zum Häm-Sauerstoff-Komplex und somit für dessen Aktivierung verantwortlich. Substitution zu sperrigeren Aminosäuren schlossen das Wasser aus und störten die Protonenübertragung, was sich negativ auf die Aktivität auswirkte.^[177] In CYP121 aus *Mycobacterium tuberculosis* wurde nach der Mutation an der korrespondierenden Position zu Glycin (A233G) ein zusätzliches Wassermolekül in der Kristallstruktur gefunden.^[178] Dieses befand sich an der Stelle, die zuvor von dem Alanin besetzt war. Daher wäre bei der Mutation A235G in CYP154F1 auch eine veränderte Wasseranordnung denkbar, was zu dem beobachteten Aktivitätsverlust geführt haben könnte. Die Mutation T234I führte hingegen zu einer vierfachen Steigerung der Aktivität gegenüber Geraniol. Weiterhin akzeptierte die Mutante (+)-Nootkaton als Substrat.

3.1.5 Mutagenese-Studien an der Position T234

Aufgrund der Steigerung der Aktivität und der Erweiterung des Substratspektrums durch den Austausch der hydrophilen Aminosäure Threonin mit dem hydrophoben Isoleucin wurde die Position 234 näher untersucht. In der Kristallstruktur ist zu sehen, dass diese Position inmitten der Substratbindetasche lokalisiert ist (Abbildung 36A). Des Weiteren ist die polare Hydroxygruppe von Threonin in Richtung des Zentrums der Substratbindetasche orientiert und behindert möglicherweise so den Zugang hydrophober Substrate zum Häm (eingekreist in Abbildung 36). Daher wurde das Threonin durch die hydrophoben Aminosäuren Methionin, Phenylalanin, Leucin, Valin, Alanin und das polare Serin substituiert und die Effekte an den Modellsubstraten untersucht. Serin wurde gewählt, weil die verwandten Enzyme CYP154A1 und CYP154A8 an der korrespondierenden Position diese Aminosäure tragen.

Außer T234F wirkten sich alle Mutationen positiv auf die Umsetzung von (+)-Nootkaton und Geraniol aus. Das sterisch anspruchsvolle Phenylalanin scheint die Substratbindetasche zu sehr zu verkleinern und so die Oxidation zu erschweren. Die Substitution durch Serin steigerte trotz ebenfalls

vorhandener Hydroxygruppe den Umsatz von Geraniol auf mehr als das Zweifache und zeigte zudem minimale Aktivität gegenüber (+)-Nootkaton.

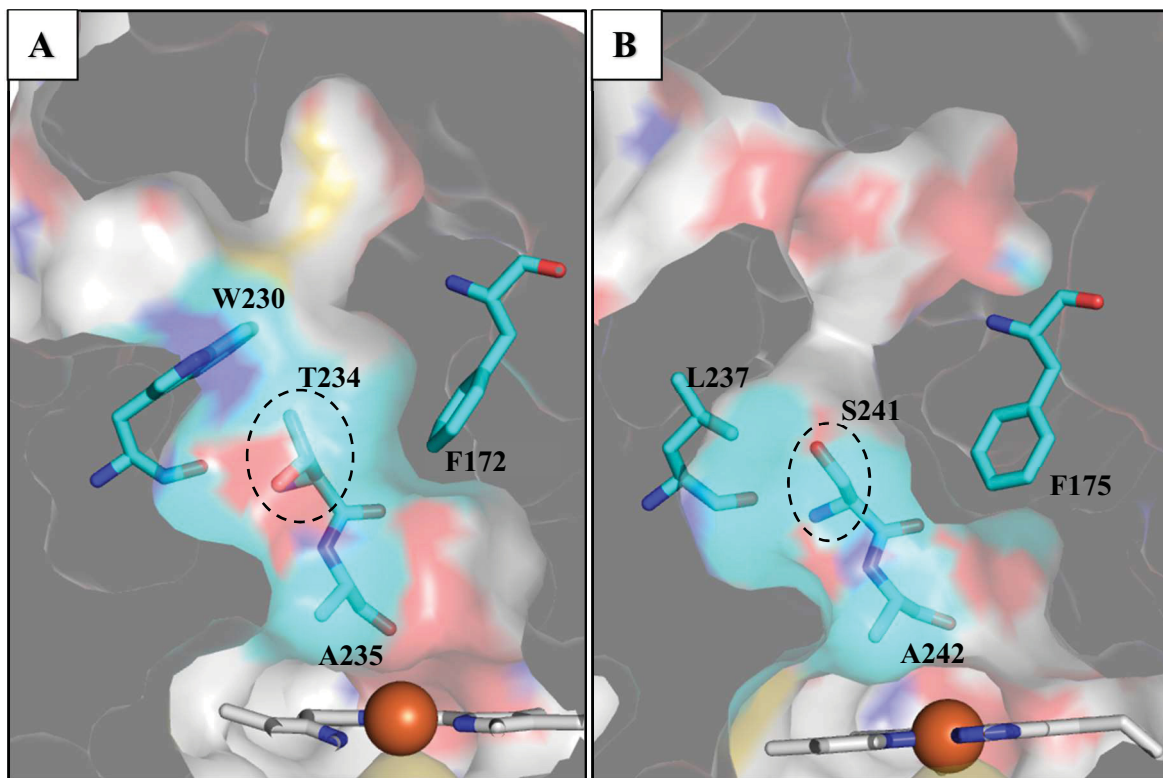


Abbildung 36. Querschnitte der Substratbindetasche von A) CYP154F1 und B) CYP154A1 (1ODO). Die für die Mutagenese-Studie ausgewählten Aminosäuren sind als Stäbe gezeigt und in Cyan hervorgehoben. Die Sauerstoffatome sind in Rot, die Schwefelatome in Gelb und die Stickstoffatome in Blau dargestellt. Die Hydroxygruppe von T234 und S241 wurde zur Verdeutlichung eingekreist. Zur Visualisierung wurde PyMOL 0.99rc6 verwendet.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die fehlende Methylgruppe von Serin im Vergleich zu Threonin eine andere Orientierung der Hydroxygruppe ermöglicht. Der Vergleich der Kristallstruktur von CYP154A1 (1ODO) und CYP154F1 spricht für diese Annahme (Abbildung 36). Die Hydroxygruppe von Serin in CYP154A1 (1ODO) ist in die entgegengesetzte Richtung ausgerichtet wie die von Threonin in CYP154F1 und ragt somit nicht in die Substratbindetasche (Abbildung 36).

Die Ergebnisse der Umsetzungen zeigten, dass die ungewöhnlich polare Substratbindetasche, bedingt durch das polare Threonin, die Bindung von hydrophoben Substraten erschwert. Die niedrigere Affinität spiegelte sich auch in den kinetischen Daten wider. Der gemessene K_M -Wert des Wildtyps mit Geraniol lag mit 426 μM dreimal höher als der K_M -Wert der Mutanten T234M und T234L (137 μM und 142 μM).

Weiterhin ist zu sehen, dass die größeren Aminosäuren Methionin und Leucin für die Umsetzung des kleineren Geraniols vorteilhaft waren, während die Mutante mit der kleinen Aminosäure Alanin an der Position 234 die höchste Aktivität gegenüber dem sterisch anspruchsvolleren (+)-Nootkaton aufwies. Die Mutationen T234M bzw. T234L führten zu einer 25- bzw. 18-fachen Steigerung des Umsatzes von Geraniol im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen die Mutante T234A doppelt so viel

(+)-Nootkaton umsetzte wie der CYP154E1 Wildtyp. Das Produkt der T234-Mutanten konnte als Nootkaton-13,14-epoxid identifiziert werden, während mit CYP154E1 die allylische Hydroxylierung zu 13-Hydroxy-Nootkaton stattfand. Eine unterschiedliche Regioselektivität kann durch die Architektur der Substratbindetaschen oder durch die verschiedenen Bindungsdissoziationsenergien bedingt sein.^[179] Da eine C=C-Doppelbindung eine ähnliche Reaktivität gegenüber einer P450-bedingten Epoxidierung wie eine allylische C-H-Bindung gegenüber einer Hydroxylierung aufweist, ist von einer leicht unterschiedlichen Orientierung des Nootkatons in der Substratbindetasche der T234-Mutanten und des CYP154E1 Wildtyps auszugehen.^[180] Die Mutation zu Alanin oder Valin führte außerdem zu einem geringfügigen Umsatz von (*E*)-Stilben. (*E*)-Stilben wurde zu (*E*)-4-Hydroxystilben umgesetzt, wohingegen CYP154E1 es zu (*E*)-4,4-Dihydroxystilben umsetzte. Interessanterweise führten diese Mutationen an der korrespondierenden Position in CYP154E1 (I238A/V) ebenfalls zu einer verbesserten Aktivität gegenüber (*E*)-Stilben.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Substratspektrum der unbekannten CYP154F1 identifiziert und die Kristallstruktur gelöst werden. Durch einen Vergleich der Homologiemodelle von CYP154F1 und CYP154E1 konnte die Aminosäure Threonin an Position 234 in CYP154F1 identifiziert werden, die maßgeblich für das enge Substratspektrum verantwortlich ist. Durch Mutationen an dieser Position konnte nicht nur das Substratspektrum erweitert, sondern auch die Aktivität gegenüber Geraniol deutlich erhöht werden. Anhand der Kristallstruktur konnte die beobachteten Struktur-Funktion-Beziehungen erklärt werden. Weiterhin liefert die Struktur die Basis für zukünftiges rationales Proteindesign von CYP154F1. Die Vorgehensweise zeigt wie eine Kombination aus struktureller Information, Mutagenese-Studien und ein Vergleich mit verwandten P450-Enzymen die Identifikation der molekularen Determinanten, die für die Eigenschaft der untersuchten P450 verantwortlich sind, ermöglicht.

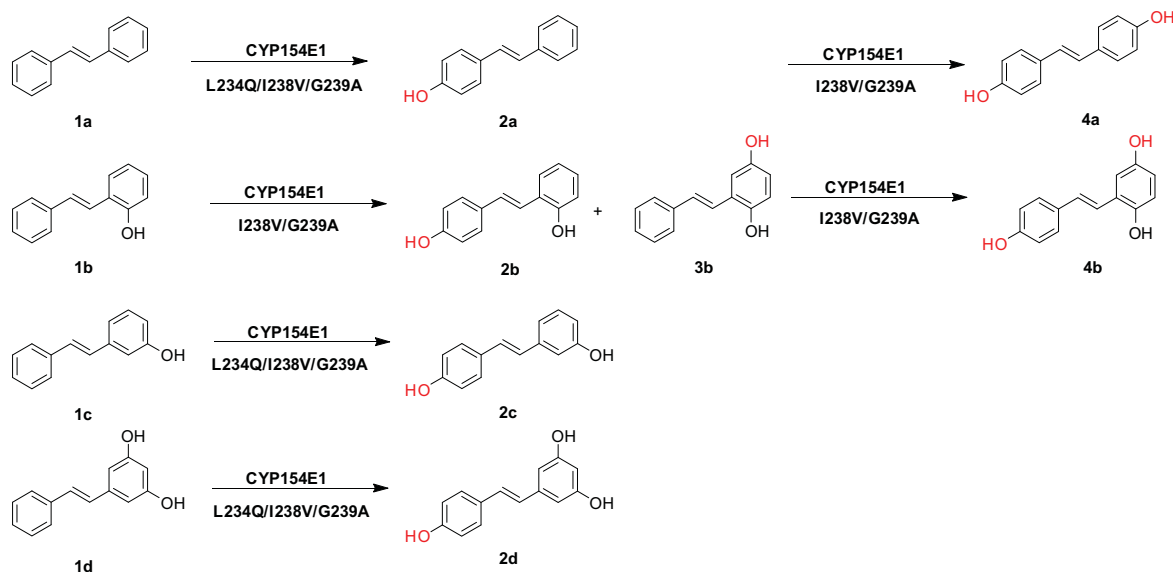
In Bezug auf die biotechnologische Anwendung könnte die Mutante T234M aufgrund der hohen Aktivität gegenüber Geraniol interessant für die *de-novo*-Synthese von Alkaloiden in rekombinanten Mikroorganismen sein. Die Hydroxylierung von Geraniol zu (*E*)-8-Hydroxygeraniol ist der Schlüsselschritt im Biosyntheseweg von Strictosidin und daher auch von den meisten anderen Monoterpen-Indolalkaloiden, wie z. B. die Krebsmedikamente Vinblastin und Vincristin.^[181–183] Diese Hydroxylierung wird in der Natur normalerweise durch pflanzliche P450-Enzyme, wie z. B. CYP76B6 aus *Catharanthus roseus*, katalysiert. Jedoch wurde die niedrige Aktivität oder das niedrige Expressionslevel von CYP76B6 als limitierender Schritt in der *de-novo*-Synthese von Strictosidin in gentechnisch veränderten Mikroorganismen erkannt.^[184,185] In einer Studie von Brown *et al.* war die Konzentration von (*E*)-8-Hydroxygeraniol trotz Integration von vier Kopien *cyp76B6* in einem Hefestamm immer noch zu niedrig und limitierte die *de-novo*-Synthese von Strictosidin.^[184] Interessanterweise zeigte die Mutante T234M eine höhere molare Aktivität als CYP76B6 gegenüber Geraniol ($K_{cat}=17,23 \text{ min}^{-1}$ vs. $7,86 \text{ min}^{-1}$).^[186] Aufgrund des hohen Expressionslevels und der mehr als zweifach höheren molaren Aktivität könnte T234M eine gute Alternative für CYP76B6 in der *de-novo*-Synthese von Monoterpen-Indolalkaloiden darstellen.

3.2 Regioselektive Hydroxylierung von (*E*)-Stilben und dessen Derivaten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, einen neuen biokatalytischen Prozess mit einer Cytochrom-P450-Monooxygenase aus der Familie 154 zu etablieren. Ferner sollte der Prozess durch verschiedene Methoden optimiert werden. Als Substrat wurde (*E*)-Stilben (**1a**) gewählt, da es zum einen günstig großtechnisch über die oxidative Kupplung von Toluol herstellbar ist. Zum anderen sind P450 in der Lage, selbst Aromaten regioselektiv zu hydroxylieren, was eine chemisch anspruchsvolle Reaktion darstellt. Das resultierende Produkt wäre der Klasse der Stilbenoide zuzuordnen, die für ihre vielfältigen biologischen und pharmazeutischen Wirkungen bekannt sind (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.1). Als P450 aus der Familie CYP154 wurde neben CYP154F1 aufgrund ihrer Substratpromiskuität CYP154A8 und CYP154E1 gewählt.^[73] In diesen Versuchen zeigten CYP154A8 und CYP154E1 Aktivität gegenüber (*E*)-Stilben (**1a**). Beide hydroxylierten (*E*)-Stilben (**1a**) in der *para*-Position, wobei CYP154E1 beide Aromaten hydroxylierte.

3.2.1 Optimierung von CYP154E1 durch ortsspezifische Mutagenese

Aufgrund der höheren Aktivität gegenüber (*E*)-Stilben (**1a**) und der zweifachen Hydroxylierung wurde CYP154E1 als das geeignetere Enzym für das semirationale Proteindesign zur Optimierung der Synthese von oxidierten Stilbenderivaten befunden. Anhand eines Homologiemodells von CYP154E1 wurden neun Positionen im aktiven Zentrum ausgewählt. Diese Positionen wurden hauptsächlich zu Aminosäuren mit raumschaffendem Effekt wie z. B. Valin oder Alanin mutiert, aber auch zu Aminosäuren, die der Konsensussequenz der charakterisierten P450 aus der Familie 154 entsprechen. Insgesamt wurde eine Auswahl von 31 Einfachmutanten erstellt und auf Aktivität gegenüber (*E*)-Stilben geprüft. Die vier Varianten L234Q, I238A, I238V und G239A zeigten dabei eine signifikante Umsatzsteigerung gegenüber dem Wildtyp. Interessanterweise waren diese Mutationen alle in der Substraterkennungsstelle 4 (SRS4) lokalisiert. Diese SRS4 liegt inmitten der I-Helix, welche direkt über die Hämebene verläuft. Mit einer fast zehnfachen Steigerung des Umsatzes hatte der Austausch der Aminosäure Glycin durch Alanin an der Position 239 den gravierendsten Effekt. Dieser Austausch führt zu dem konservierten Motiv AGxxT.^[33] Die Position befindet sich in der Nähe des Häms (gelb gefärbt in Abbildung 37). Denkbar wäre, dass die zusätzliche Methylgruppe vom Alanin (orange gefärbt in Abbildung 37B) den zum Häm gewandten aromatischen Ring des Substrats in Richtung des Hämeisens drückt und so die Hydroxylierung erleichtert. Die Varianten L234Q, I238A und I238V hatten untereinander einen vergleichbaren Effekt auf den Umsatz von (*E*)-Stilben (**1a**). Die Aktivität dieser Mutanten lag in etwa dreimal so hoch wie die des Wildtyps. Die Position I238 entspricht T234 in CYP154F1 und befindet sich im oberen Bereich der Substratbindetasche (in Magenta in Abbildung 37 gekennzeichnet). Die Mutationen T234A und T234V in CYP154F1 waren ebenfalls vorteilhaft für die Umsetzung von (*E*)-Stilben (Kapitel 2.4). Der Austausch zu Valin oder Alanin vergrößert das Volumen der Substratbindetasche und erleichtert dadurch vermutlich die Bindung von (*E*)-Stilben (**1a**). Die Position L234 befindet sich am Anfang des Substrateingangskanals (cyan gefärbt in Abbildung 37). Weshalb hier die Mutation von Leucin zu Glutamin zu einem höheren Umsatz führt, lässt sich nicht genau erklären.



Schema 9. Übersicht der umgesetzten Stilbene. Unter dem Reaktionspfeil wurde die entsprechende Mutante angegeben, mit der für die jeweilige Reaktion die höchsten Umsätze erzielt worden sind. Die eingefügte Hydroxygruppe ist rot markiert.

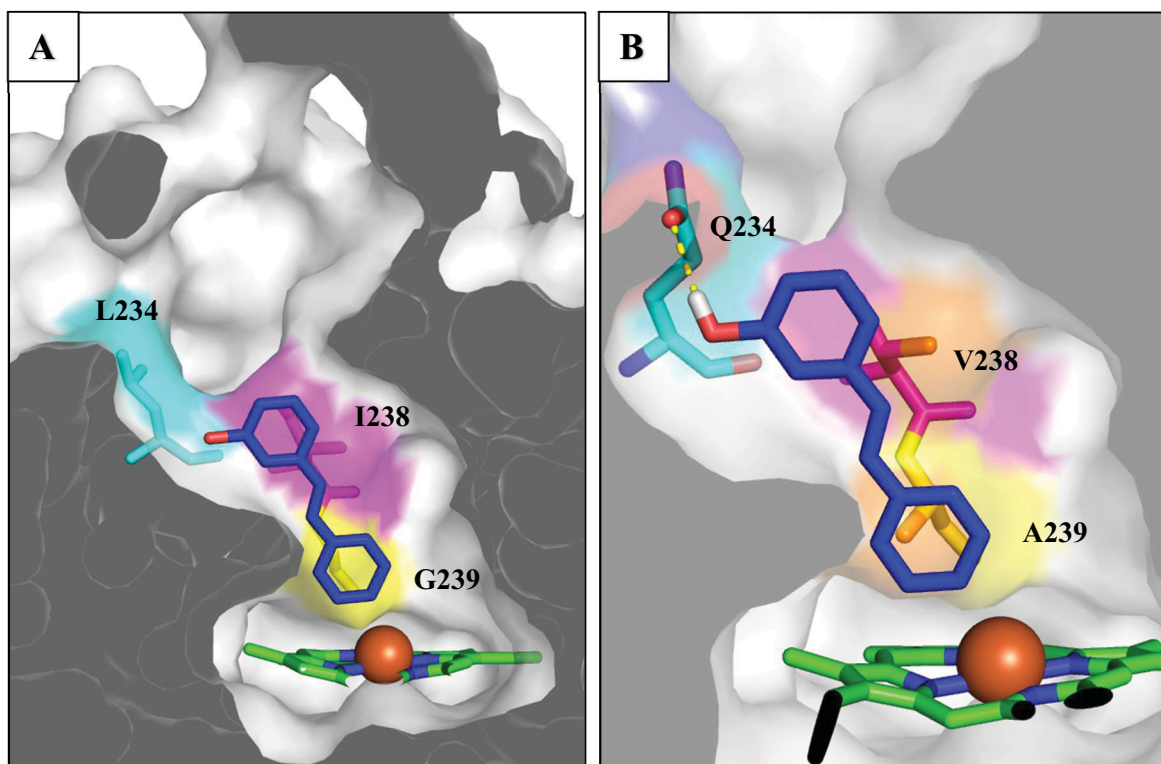


Abbildung 37. Querschnitt der Substratbindetasche von CYP154E1. Zur Veranschaulichung wurde (*E*)-3-Hydroxystilben (blau) mit Pymol in die Bindetasche eingefügt. A) Substratbindetasche von CYP154E1 Wildtyp. B) Illustration der potentiellen Wechselwirkungen der L234/I238V/G239A-Mutante mit dem Substrat (*E*)-3-Hydroxystilben (1c). Die mögliche Fixierung des Substrats über eine Wasserstoffbrückenbindung ist durch eine gelb gestrichelte Linie angedeutet. Weiterhin sind die Methylgruppen von V238 und A239, die wahrscheinlich mit dem Substrat interagieren, orange gefärbt. Die Position 234 ist in Cyan, 238 in Magenta und 239 in Gelb gefärbt. Das Homologiemodell wurde mit Hilfe des SWISS-MODEL Servers^[139–142] erstellt und basiert auf der Kristallstruktur von CYP154F1. Zur Visualisierung wurde PymOL 0.99rc6 verwendet.

Die Annahme, dass eine Kombination der oben genannten Mutationen additive Effekte bezüglich der Umsatzsteigerung hat, bestätigte sich. Des Weiteren wurden mit dem Wildtyp und den Mutanten die Stilbenderivate (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**), (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**), Pinosylvin (**1d**) und umgesetzt. Diese Ergebnisse deuten auf eine Toleranz gegenüber Substituenten am aromatischen Ring von (*E*)-Stilben (**1a**) hin. Bei genauerer Analyse der Ergebnisse lässt sich allerdings auch eine Präferenz der Mutanten gegenüber den getesteten Stilbenderivaten feststellen. So zeigte sich, dass die Mutation L234Q für die Umsetzung von (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) vorteilhaft war, nicht aber für (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) und (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**). Die Position L234 befindet sich am Anfang des Substrateingangskanals (in Cyan gefärbt in Abbildung 37). CYP154C5 besitzt in dieser Position ebenfalls ein Glutamin, weshalb zu dieser Aminosäure mutiert wurde. In der Kristallstruktur von CYP154C5 ist zu sehen, dass dieses Glutamin über wasservermittelte Wasserstoffverbindungen das Substrat Progesteron in der Bindetasche fixiert.^[36] Eine ähnliche Fixierung wäre bei den Substraten (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) denkbar, was den höheren Umsatz erklären könnte. (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) besitzen eine bzw. zwei Hydroxygruppen in der *meta*-Position. Diese Hydroxygruppen könnten eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Glutamin 234 bilden und so die Hydroxylierung des unsubstituierten aromatischen Ringes erleichtern (Abbildung 37B).

Weiterhin ist eine Präferenz von Valin in der Position 238 gegenüber (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) zu erkennen. Der Austausch von I238A wirkte sich hingegen vorteilhaft gegenüber (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) aus. Hier könnten sterische Effekte zu diesen Beobachtungen führen. Wie in Abbildung 37 zu erkennen ist, befindet sich diese Position (in Magenta gefärbt) im oberen Teil der Substratbindetasche. Denkbar wäre, dass die Methylgruppe in Valin 238 (orange in Abbildung 37B gekennzeichnet) mit einer Hydroxygruppe in *ortho*-Position interagiert, nicht aber mit einer Hydroxygruppe in *meta*-Position.

Kinetische Parameter der Umsetzung von (*E*)-Stilben mit CYP154E1

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die kinetischen Daten des Wildtyps und der Mutanten G239A und L234Q/I238V/G239A für die Oxidation von (*E*)-Stilben (**1a**) bestimmt. Den größten Effekt hatte die Einführung der Mutation G239A. Diese führte zu einem k_{cat} -Wert von $15,2 \text{ min}^{-1}$. Der Wert konnte durch die Einführung der Mutationen L234Q und I238V zur Mutante L234Q/I238V/G239A weiter auf $24,6 \text{ min}^{-1}$ gesteigert werden. Durch das Proteinengineering konnte die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) und der k_{cat} -Wert insgesamt auf mehr als das Sechsfache gesteigert werden. Die k_{cat} -Werte literaturbekannter Hydroxylierungen von Stilbenderivaten liegen im Vergleich deutlich niedriger. Kim *et al.* führten Mutagenese-Studien an P450-BM3 durch mit dem Ziel, die Aktivität der Hydroxylierung von Resveratrol zu Piceatannol zu erhöhen.^[187] Die beste Mutante erreichte nur einen k_{cat} -Wert von 4 min^{-1} . Dabei ist zu beachten, dass der in dieser Arbeit gemessene k_{cat} -Wert sich auf eine zweifache Hydroxylierung zu (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) bezieht. Des Weiteren wurden die K_D -Werte des Wildtyps und der Mutanten G239A und L234Q/I238V/G239A gegenüber (*E*)-Stilben (**1a**) bestimmt. Die K_D -Werte lagen im submikromolaren Bereich, was die hohe Affinität von (*E*)-Stilben zu den Mutanten und dem Wildtyp widerspiegelt. Die Mutationen führten zu

niedrigeren K_D -Werten im Vergleich zum Wildtyp, wobei die Mutante L234Q/I238V/G239A den niedrigsten Wert von 350 nM aufwies. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine verbesserte Bindung von (*E*)-Stilben durch die eingefügten Mutationen resultiert. Diese niedrigen K_D -Werte gegenüber (*E*)-Stilben könnten für die höhere Aktivität der Mutanten mitverantwortlich sein.

3.2.2 Regioselektivität der Stilbenhydroxylierung

Die Regioselektivität der beschriebenen Umsetzungen lässt sich anhand einer Kombination zweier Effekte erklären. Zum einen folgt die P450-katalysierte aromatische Hydroxylierung den Regeln der elektrophilen aromatischen Substitution.^[25,26,188] Das heißt, Elektronendonoren als Substituenten aktivieren den Aromaten und dirigieren das Elektrophil in die *ortho*- und *para*-Position. Elektronenakzeptoren deaktivieren den Aromaten hingegen und dirigieren in die *meta*-Position. Zum anderen trägt auch die Architektur des aktiven Zentrums zur Regioselektivität bei. Die Styrylgruppe in Stilbenen fungiert als Elektronendonor und aktiviert daher die *ortho*- und die *para*-Position. Die Hydroxylierung erfolgte allerdings ausschließlich in der *para*-Position, woraus sich folgern lässt, dass die *ortho*-Hydroxylierung sterisch durch das aktive Zentrum des Enzyms gehindert ist.

Da eine Hydroxygruppe ein stärkerer Elektronendonor als eine Styrylgruppe ist, wurde (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) am substituierten Ring in der Position 5 anstatt in der Position 4 zu (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) bzw. (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) hydroxyliert (Abbildung 38A). Hydroxygruppen in der Position 3 bzw. 5 scheinen die benachbarte Position 4 zu blockieren, da bei den Substraten (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvin (**1d**) nur der unsubstituierte Ring hydroxyliert wurde (Abbildung 38B).

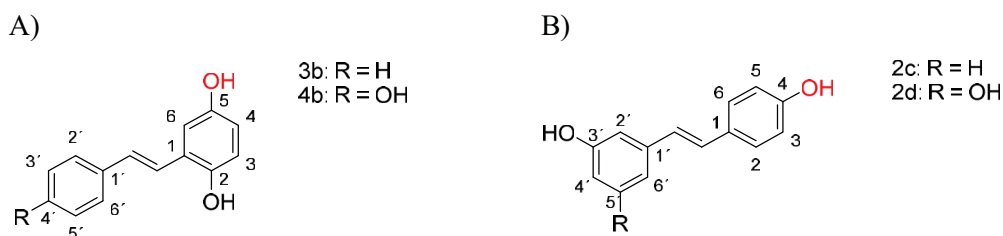


Abbildung 38. Regioselektivität von CYP154E1-Mutanten in Abhängigkeit der Substituenten. Die eingefügte Hydroxygruppe ist rot markiert.

3.2.3 Optimierung der Umsetzungen durch Zugabe von Methyl- β -Cyclodextrin

Hohe Substratkonzentrationen können sich aus verschiedenen Gründen negativ auf einen biokatalytischen Prozess auswirken. Das Substrat oder das entstehende Produkt kann z. B. toxisch auf die Enzyme wirken und so den Prozess negativ beeinflussen.^[39] Ebenfalls ist eine Substrat- oder Produktinhibierung möglich. Cytochrom-P450-Monooxygenasen akzeptieren hauptsächlich hydrophobe Substrate, weshalb deren Löslichkeit einen weiteren wichtigen Faktor für die Biokatalyse mit P450-Enzymen darstellt. Zur Umgehung dieser Problematik kann ein 2-Phasensystem aus einem inerten organischen Lösungsmittel und Wasser verwendet werden.^[189] Die organische Phase dient hierbei als Substratreservoir und hält die Substratkonzentration in der wässrigen Phase auf einem konstanten Niveau.^[85] Die Anwendung eines Kosolvenz kann ebenfalls

die Löslichkeit steigern, verhindert allerdings nicht die toxischen oder inhibitorischen Effekte.^[190] Bei diesen beiden Möglichkeiten ist aber zu beachten, dass die zugegebenen Lösungsmittel selbst zur Destabilisierung der Enzyme beitragen können. Eine weitere Möglichkeit ist die Zugabe von Cyclodextrinen. Cyclodextrine bilden mit geeigneten Substraten/Produkten Einschlussverbindungen und erhöhen dadurch deren Löslichkeit. Zudem verhindern sie die toxischen und inhibitorischen Effekte der Substrate bzw. Produkte.^[150,151] Bei den ersten Umsetzungen wurde 2-4 % DMSO hinzugefügt. Trotzdem konnte die Substratkonzentration nicht über 1 mM erhöht werden ohne eine Verringerung des Umsatzes. Da aus der Literatur bekannt ist, dass Stilbenoide mit Cyclodextrinen Einschlussverbindungen bilden, wurde Methyl- β -Cyclodextrin (**CD**) eingesetzt.^[148,149] Auf diese Weise konnten z. B. Konzentrationen von bis zu 20 mM anstatt 1 mM des Substrats (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) umgesetzt werden. Sehr hohe Überschüsse von **CD** in der Oxidation von (*E*)-Stilben (**1a**) verhinderten zum Teil die Weiterreaktion des Intermediates (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**). Die Akkumulation von (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) deutet darauf hin, dass (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) eine stärkere Bindung mit **CD** eingeht als das Substrat (*E*)-Stilben (**1a**), was wahrscheinlich auf Wasserstoffbrückenbindung der Hydroxygruppen von (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) mit den polaren Gruppen des zylindrischen **CD** zurückzuführen ist. Mit diesem Wissen war es möglich, den Grad der Hydroxylierung durch unterschiedliche Konzentrationen von **CD** zu beeinflussen. Ohne Zugabe von **CD** wurde z. B. (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) zu (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) zweifach hydroxyliert. Durch Zugabe von **CD** konnte das einfach hydroxylierte Produkt (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**) abgefangen und isoliert werden.

Die hier vorgestellte Methode aus einer Kombination von semirationalem Proteindesign und der Verbesserung der Reaktionsbedingung durch Zugabe von **CD** ermöglichte einen Umsatz von 8-20 mM der Substrate **1a-1d**. Da nur geringe Mengen von 1 μ M P450 (0,005 mol%) eingesetzt wurden, ergibt sich eine hohe *total turnover number* (TTN) von 20.000, was die Effektivität der Reaktion widerspiegelt. Die TTN ist definiert als die Substratmenge, die ein Molekül P450 im gesamten Inkubationszeitraum umsetzt. Ferner deuten die Daten darauf hin, dass bei Erhöhung der P450-Konzentration eine weitaus höhere Substratkonzentration umgesetzt werden könnte. So wurde bei der Umsetzung von 12 mM (*E*)-Stilben (**1a**) mit 1 μ M P450 45,5 % umgesetzt, während mit 5 μ M P450 100 % umgesetzt wurde. Im Vergleich zu literaturbekannten mikrobiellen Synthesen von Stilbenoiden liegen die in dieser Arbeit erreichten Produkttiter deutlich höher (siehe Einleitung).

3.2.4 Biologische Aktivität der hergestellten Stilbenoide

Stilbenoide sind für ihre vielfältigen biologischen Aktivitäten bekannt (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.1) und daher u.a. für pharmazeutische Anwendungen interessant. Das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) ist ein natürlich vorkommender Inhaltsstoff der Yucca-Palme (*Yucca periculosa*).^[191] Frühere Untersuchungen belegten, dass die Hydroxygruppe in *para*-Position von Resveratrol maßgeblich für dessen biologische Aktivität verantwortlich ist.^[192-194] Auf der Suche nach einem aktiveren Stilbenoid ist daher (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben mit seinen zwei Hydroxygruppen in *para*-Position in den Fokus der Wissenschaft gerückt.^[195,196] Mehrere Studien zeigten überlegenere pharmakologische Eigenschaften gegenüber Resveratrol bezüglich der

antiproliferativen,^[196–198] antioxidativen^[195,199,200] und vasoaktiven^[201] Aktivität. So berichteten Savio *et al.*^[196] und Maccario *et al.*^[197] über eine stärkere Inhibierung der Proliferation von LF1-Zellen (menschliche Lungenfibroblasten) und MCF-7-Zellen (menschliche Brustkrebs-Zelllinie) bei niedrigeren Konzentrationen. Weiterhin wurde in einer *in-vivo*-Studie nachgewiesen, dass (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) das Tumorwachstum und die Tumormetastasierung in der Lunge und Leber von Mäusen verhindert.^[202]

Pinosylvin (**1d**) wurde zu Resveratrol (**2d**) umgesetzt, dem wohl bekanntesten Stilbenoid (siehe Einleitung, Kapitel 1.2).

(*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) wurde zu (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (**2c**) umgesetzt. (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (**2c**) wurde in den Wurzeln der Gartenhortensie (*Hydrangea macrophylla*) nachgewiesen und zeigte eine höhere Aktivität in der Inhibierung der Proliferation von Darmkrebszellen (HT-29) im Vergleich zu Resveratrol.^[91,203]

(*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**) wurde zu (*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (**2b**) und (*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**) und (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) umgesetzt, wovon (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**) und (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) isoliert wurden. Das natürliche Vorkommen dieser Stilbene wurde noch nicht bestätigt. Allerdings wurden vor kurzem radioprotektive Eigenschaften für (*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (**2b**) nachgewiesen.^[204]

4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte das bisher nicht untersuchte Enzym CYP154F1 aus *T. fusca* YX bezüglich des Substratspektrums charakterisiert werden. Des Weiteren konnten aufgrund eines Vergleichs der 3D-Strukturen von CYP154F1 und CYP154E1 und mit Hilfe daraus abgeleiteter Mutagenese-Studien, die molekularen Determinanten für das enge Substratspektrum von CYP154F1 bestimmt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass kleine Veränderungen an Schlüsselpositionen wie z. B. an Thr234 gravierende Auswirkungen bezüglich der biokatalytischen Eigenschaften haben können.

Da nun aufgrund der Kristallstruktur ein rationales Proteindesign möglich ist, wären aufbauende Mutagenese-Studien zu CYP154F1 interessant. Zum Beispiel wäre eine Kombination der bindetaschenvergrößernden Mutationen W230L und F172L mit T234A oder T234L für die Umsetzung von größeren Substraten denkbar.

Weiterhin konnte mit Hilfe von CYP154E1-Mutanten ein neuer biokatalytischer Prozess für die Herstellung biologisch aktiver Stilbenoide entwickelt werden. Insgesamt konnten die fünf Stilbenoide (*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (**2b**), (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (**2c**), Resveratrol (**2d**), (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) und (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) hergestellt werden. Davon wurden im Rahmen dieser Studie die Verbindungen (*E*)-2,4-Dihydroxystilben (**2b**), (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (**2c**), (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) und (*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) zum ersten Mal mit Hilfe von heterolog exprimierten Enzymen hergestellt. Besonders für die Synthese von (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) wird der Vorteil der hier vorgestellten enzymatischen Methode deutlich. Für die chemische Darstellung werden je nach Syntheseweg teurere Ausgangsprodukte, Schwer- oder Übergangsmetalle, (toxische) Lösungsmittel und hohe Temperaturen benötigt. Zudem sind mehrere Reaktionsschritte nötig wie z. B. für die Synthese der Ausgangsprodukte oder die Anbringung und Entfernung von Schutzgruppen. Für den im Rahmen dieser Studie vorgestellten Syntheseweg wird hingegen nur das günstige Ausgangsprodukt (*E*)-Stilben (**1a**) benötigt, welches von CYP154E1 direkt zweifach mit 100 %iger Regioselektivität zu (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben hydroxyliert wird.

In weiterführenden Experimenten könnte mittels rationalen Proteindesigns die Regioselektivität von CYP154E1 verändert werden. So könnte die Vielfalt der hergestellten Stilbenoide weiter erhöht werden. Außerdem wäre es interessant, die im Rahmen dieser Studie synthetisierten Stilbenoide alle ausgehend von (*E*)-Stilben (**1a**) durch mehrere regioselektive Hydroxylierungen herzustellen. Dadurch würden weitere chemische Syntheseschritte eingespart und so die Umweltfreundlichkeit und Nachhaltigkeit dieses biokatalytischen Prozesses noch weiter gesteigert werden. Da frühere Versuche zur Lösung der Kristallstruktur von CYP154E1 missglückten^[134], könnte die in dieser Arbeit gelöste Kristallstruktur von CYP154F1 aufgrund der hohen Verwandtschaft zu CYP154E1 als Template für die Erstellung eines genaueren Homologiemodells dienen und somit für das Proteindesign behilflich sein.

Des Weiteren ist bekannt, dass Laccasen und Peroxidasen in der Lage sind, Stilbenoide oxidativ zu oligomerisieren.^[114,205–207] Oligostilbenoide weisen ebenfalls signifikante biologische Aktivitäten

auf, wie z. B. antioxidative, antimikrobielle und entzündungshemmende Eigenschaften.^[86] Daher wäre eine Kaskadenreaktion oder die sequentielle Zugabe von P450 und einer Laccase bzw. Peroxidase denkbar. So könnten in einem Ein-Topf-Prozess biokatalytisch aus simplen Molekülen wie (*E*)-Stilben komplexe Oligostilbenoide mit interessanten und neuen Eigenschaften hergestellt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien, Enzyme, Puffer

Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, VWR, Carl Roth, Merck oder AppliChem erworben. Die Stilbenoide (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**), (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) wurden in Kooperation mit Dragutin Antovic (Institut für Organische Chemie, Universität Düsseldorf) synthetisiert. (*E*)-8-Hydroxygeraniol wurde in früheren Studien synthetisiert und war schon am unseren Institut vorhanden ^[81].

Enzyme

Die Restriktionsenzyme *DpnI*, *NdeI* und *EcoRI*, die Phusion[®]-Polymerase und die T4 DNA Ligase wurden von Thermo Scientific bezogen. Die Katalase wurde von Sigma Aldrich erworben.

Tabelle 10. Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Puffer für die Agarosegelelektrophorese		
	eingesetzte Mengen	Komponente
TAE-Puffer (50x)	242 g	Tris
	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	57 ml	Essigsäure
	ad 1 l	dH ₂ O
DNA-Probenpuffer	10 mg	Orange G
	2 g	Saccharose
	ad 5 ml	dH ₂ O
Agarosegel	40 ml	TAE-Puffer (1x)
	6 µl	Ethidiumbromid (10mg/ml)
	0,32 g	Agarose
Puffer für die Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen		
TfbI	0,59 g	Kaliumacetat
	2 g	MnCl ₂ x 5 H ₂ O
	30 ml	Glycerin
	2,42 g	RbCl
	0,29 g	CaCl ₂
	ad 200 ml	dH ₂ O
	pH 5,8	mit Essigsäure einstellen,
		steril filtrieren

TfbII	0,12 g	RbCl
	15 ml	Glycerin
	0,21 g	MOPS
	1,1 g	CaCl ₂
	ad 100 ml	dH ₂ O
	pH 6,5	pH-Wert mit NaOH einstellen,
		steril filtrieren
<i>Rapid ligation buffer (2x)</i>	132 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	20 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
	2 mM	ATP
	15 %	PEG 8000
Nährmedien		
LB-Medium	8 g	Natriumchlorid
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Typton
	ad 1 l dH ₂ O	auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren
TB-Medium	24 g	Hefeextrakt
	12 g	Trypton
	4 ml	Glycerin
	ad 0,9 l dH ₂ O	autoklavieren
	0,1 l	Phosphatpuffer (10x)
Phosphatpuffer (10x)	0,17 M	Kaliumdihydrogenphosphat
	0,72 M	Dikaliumhydrogenphosphat
		auf pH 7 einstellen und autoklavieren
LB-Agar	8 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Trypton
	15 g	Agar
Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese		
SDS-Laufpuffer (5x)	15 g	Tris
	72 g	Glycin
	5 g	SDS
	ad 1 l	dH ₂ O

Lower Tris Puffer	72,68 g	Tris
	1,6 g	SDS
	ad 400 ml	dH ₂ O
		auf pH 8,8 mit HCl einstellen
Upper Tris Puffer	12,12 g	Tris
	0,8 g	SDS
	ad 200 ml	dH ₂ O
		auf pH 6,8 HCl einstellen
SDS-Probenpuffer	2 ml	Tris/HCl (1M, pH 6,8)
	190 mg	MgCl ₂
	0,8 g	SDS
	2 ml	Glycerin
	0,2 M	Dithiothreitol
	ad 20 ml	dH ₂ O
SDS-Färbelösung	600 ml	Methanol
	200 ml	Essigsäure
	5 g	Coomassie Brilliant blue
SDS-Entfärbelösung	300 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	600 ml	dH ₂ O
SDS-Sammelgel (4 %)	3,7 ml	dH ₂ O
	1,5 ml	Upper Tris Puffer
	0,78 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid
	60 µl	10 % APS
	6 µl	TEMED
SDS-Trenngel (12,5 %)	4 ml	Lower Tris Puffer
	6,66 ml	dH ₂ O
	5,34 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid
	80 µl	10 % APS
	8 µl	TEMED

Puffer für die Proteinaufreinigung mit der Nickel-Affinitätschromatographie		
Lysispuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
		Auf pH 8 mit NaOH einstellen
Waschpuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
		auf pH 8 mit NaOH einstellen
Elutionspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
		auf pH 8 mit NaOH einstellen
Puffer für die Größenausschlusschromatographie mit der Entsalzung Säule PD-10		
Entsalzungspuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris
	5 %	Glycerin
		auf pH 7,5 mit HCl einstellen

5.1.2 Plasmide, Stämme, Oligonukleotide

Plasmide

Alle Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden sind in Tabelle 11 gelistet

Tabelle 11. Beschreibung der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Größe (bp)	Merkmale	Referenz/Anbieter
pET-28a(+)	5369	Kan-Resistenz pBR322 Replikationsursprung T7 Promotor T7 Terminator His ₆ kodierende Sequenz <i>lacI</i> kodierende Sequenz	Novagen
pET-22b(+)	5493	Amp-Resistenz pBR322 Replikationsursprung T7 Promotor T7 Terminator <i>lacI</i> kodierende Sequenz	Novagen
pET-16b(+)	5711	Amp-Resistenz pBR322 Replikationsursprung T7 Promotor T7 Terminator <i>lacI</i> kodierende Sequenz	Novagen
pET-22b(+)_GDH	6153	pET-22b(+) mit der Gen <i>GDHIV</i> zwischen <i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> kloniert. (GenBank D10626)	[208]
pET-16b(+)_YkuN	5847	pET-16b(+) mit dem Gen <i>YkuN</i> zwischen <i>XhoI</i> und <i>BamHI</i> kloniert (Gen-ID) 939194)	[72]
pET-16b(+)_FdR	5886	pET-16b(+) mit dem Gen <i>YkuN</i> zwischen <i>NocI</i> und <i>BamHI</i> kloniert (Gen-ID 948414)	[72]
pET-28a(+)_CYP154E1	6341	pET-28a(+) mit dem Gen <i>CYP154F1</i> zwischen <i>NdeI</i> und <i>EcoRI</i> (GenBank AAZ57009)	[73]
pET-28a(+)_CYP154F1	6449	pET-28a(+) mit dem Gen <i>CYP154F1</i> zwischen <i>NdeI</i> und <i>EcoRI</i> (GenBank AAZ55783)	

Bakterienstämme

Die Bakterienstämme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet worden sind, sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12. Verwendete Bakterienstämme und deren Charakteristika.

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁺ supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) endA1 recA1 gyrA96 thi-1relA1 hsdR17	Clontech
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁺ ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)	Novagen

Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden für die Klonierung (CYP154F1), Sequenzierung bzw. für die ortsspezifische Mutagenese von CYP154F1 und CYP154E1 verwendet (Tabelle 13).

Tabelle 13. Oligonukleotide für die Klonierung, ortsspezifische Mutagenese bzw. Sequenzierung. Das geänderte Codon ist durch einen Unterstrich markiert. ^aOligonukleotide wurden für die 'round-the-horn' Mutagenese verwendet. ^bOligonukleotide für eine modifizierte QuikChange®-PCR verwendet ^[209]. ^cOligonukleotide wurden für die Overlap-Extension-PCR zur Einfügung von 3 Mutationen verwendet.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
CYP154F1	
FW: CYP154F1_l.v.	TTAACTCATATGGCAGCAGTCCCAGAACCC
RV: CYP154F1	ATGAATTCTATGCGGCAGTCCGGCG
^b FW: CYP154F1_F172L	CACGGCGCTCTCCCCGTCTCGCCGAGGAAGTGCCTG
^b RV: CYP154F1_F172L	CGGGGAGAGCGCCGTGTTGACCATCTGCTGCATGCGGCCG
^b FW: CYP154F1_W230L	CACCTGTGGCTCTGGTCACTGCCGGGTTTGAGACCACG
^b RV: CYP154F1_W230L	ACCAGGAGCAACAGGGTGTGCGCAGCTCCGCGTCG
^b FW: CYP154F1_T234I	CCTGGTCATTGCCGGGTTTGAGACCACGTCTCTGCGCTTGCC
^b RV: CYP154F1_T234I	CAAACCCGGCAATGACCAGGAGCCACAGGGTGTGCGCAGC
^b FW: CYP154F1_A235G	CTGGTCACTGGCGGGTTTGAGACCACGTCTCTGCGCTTGCC
RV: CYP154F1_A235G	CAAACCCGCCAGTGACCAGAGCCACAGGGTGTGCGCAGC
^a FW: CYP154F1_T234L	CTGGCCGGGTTTGAGACCACGTCC
^a FW: CYP154F1_T234V	GTTGCCGGGTTTGAGACCACGTCC
^a FW: CYP154F1_T234A	GCA GCCGGGTTTGAGACCACGTCC
^a FW: CYP154F1_T234S	TCGGCCGGGTTTGAGACCACGTCC
^a FW: CYP154F1_T234F	TTCCGCCGGGTTTGAGACCACGTCC
^a FW: CYP154F1_T234W	TGGGCCGGGTTTGAGACCACGTCC
^a FW: CYP154F1_T234M	ATGGCCGGGTTTGAGACCACGTCC
^a RV: CYP154F1_T234	GACCAGGAGCCACAGGGTGTGCGC
^c FW: CYP154F1_W230L/T234I/A235G	ACCCTGTTGCTCCTGGTCAATTGGCGGGTTTGAGACCACGTCC
^c RV: CYP154F1_W230L/T234I/A235G	GCCAATGACCAGGAGCAACAGGGTGTGCGCAGCTCC
CYP154E1	
^a FW: CYP154E1_L94A	GCGGCCGCTCCGAGCGGAC
^a FW: CYP154E1_L94I	ATCGCCGCTCCGAGCGGAC
^a FW: CYP154E1_L94V	GTAGCCGCTCCGAGCGGAC
^a FW: CYP154E1_L94F	TTCCGCCGCTCCGAGCGGAC
^a RV: CYP154E1_L94	CATGGATTCCACGCGCAGCATGTTGGC
^a FW: CYP154E1_T178A	GCACTCTCCGGCACGGACCCTGAGGC
^a FW: CYP154E1_T178G	GGACTCTCCGGCACGGACCCTGAGGC
^a FW: CYP154E1_T178F	TTCTCTCCGGCACGGACCCTGAGGC
^a FW: CYP154E1_T178L	CTTCTCTCCGGCACGGACCCTGAGGC
^a FW: CYP154E1_T178V	GTTCTCTCCGGCACGGACCCTGAGGC
^a RV: CYP154E1_T178	GCGCGTACCAGCGTCTGCAACGTG
^a FW: CYP154E1_L179F	TTTTCCGGCACGGACCCTGAGGCCAACG
^a FW: CYP154E1_L179A	GCA TCCGGCACGGACCCTGAGGCCAACG
^a FW: CYP154E1_L179G	GGATCCGGCACGGACCCTGAGGCCAACG

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
^a FW: CYP154E1_T179I	<u>ATCTCCGGCACGGACCCTGAGGCCAACG</u>
^a FW: CYP154E1_T179V	<u>GTTTCCGGCACGGACCCTGAGGCCAACG</u>
^a RV: CYP154E1_T179	<u>GGTGCGCGTCACCAGCGTCTGCAACG</u>
^a FW: CYP154E1_L234Q	<u>CAACTGCTCATCATCGGCGGGTTCG</u>
^a RV: CYP154E1_L234	<u>CGTGTGTGGATCAGCTCGGTTTCAC</u>
^a FW: CYP154E1_L235I	<u>ATCCTCATCATCGGCGGGTTCGAAACC</u>
^a FW: CYP154E1_L235A	<u>GCACTCATCATCGGCGGGTTCGAAACC</u>
^a RV: CYP154E1_L235	<u>CAGCGTGTGTGGATCAGCTCGG</u>
^a FW: CYP154E1_I238A	<u>GCTGGCGGGTTCGAAACCACCATGG</u>
^a FW: CYP154E1_I238L	<u>CTCGGCGGGTTCGAAACCACCATGG</u>
^a FW: CYP154E1_I238V	<u>GTCGGCGGGTTCGAAACCACCATGG</u>
^a RV: CYP154E1_I238	<u>GATGAGCAGCAGCGTGTGTGGATCAG</u>
^a FW: CYP154E1_G239V	<u>GTTGGGTTCGAAACCACCATGGGC</u>
^a FW: CYP154E1_G239L	<u>CTGGGGTTCGAAACCACCATGGGC</u>
^a FW: CYP154E1_G239I	<u>ATTGGGTTCGAAACCACCATGGGC</u>
^a FW: CYP154E1_G239F	<u>TTCGGGTTCGAAACCACCATGGGC</u>
^a FW: CYP154E1_G239S	<u>TCGGGGTTCGAAACCACCATGGGC</u>
^a FW: CYP154E1_G239A	<u>GCGGGGTTCGAAACCACCATGGGC</u>
^a RV: CYP154E1_G239	<u>GATGATGAGCAGCAGCGTGTGTG</u>
^b FW: CYP154E1_I234Q/238V/239A	<u>GATCCACAACACGCAGCTGCTCATCGTCGCG</u>
^b RV: CYP154E1_I234Q/238V/239A	<u>CGCGACGATGAGCAGCTGCGTGTGTGGATC</u>
^b FW: CYP154E1_I234Q/238A/239A	<u>GATCCACAACACGCAGCTGCTCATCGCAGCG</u>
^b RV: CYP154E1_I234Q/238A/239A	<u>CGCTGCGATGAGCAGCTGCGTGTGTGGATC</u>
^b FW: CYP154E1_G239A/I238V	<u>GCTGCTGCTCATCGTCGCGGGGTTCGAAACC</u>
^b RV: CYP154E1_G239A/I238V	<u>GGTTTCGAACCCCGCAGCATGAGCAGCAGC</u>
^b FW: CYP154E1_G239A/I238A	<u>GCTGCTGCTCATCGCAGCGGGGTTCGAAACC</u>
^b RV: CYP154E1_G239A/I238A	<u>GGTTTCGAACCCCGCTGCGATGAGCAGCAGC</u>
^b FW: CYP154E1_G239A/L234Q	<u>GATCCACAACACGCAGCTGCTCATCATCGCG</u>
^b RV: CYP154E1_G239A/L234Q	<u>CGCGATGATGAGCAGCTGCGTGTGTGGATC</u>
^a FW: CYP154E1_V286L	<u>CTGGTCATGCTGCCGTTCTGTACACC</u>
^a FW: CYP154E1_V286F	<u>TTCGTCATGCTGCCGTTCTGTACACC</u>
^a FW: CYP154E1_V286A	<u>GCCGTCATGCTGCCGTTCTGTACACC</u>
^a FW: CYP154E1_V286G	<u>GGTGTGTCATGCTGCCGTTCTGTACACC</u>
^a FW: CYP154E1_V286T	<u>ACGGTCATGCTGCCGTTCTGTACACC</u>
^a FW: CYP154E1_V286S	<u>TCAGTCATGCTGCCGTTCTGTACACC</u>
^a RV: CYP154E1_V286	<u>CGCTGATTCTGAAGCGCAGGCACTCC</u>
^a FW: CYP154E1_M388Q	<u>CAAAACCATCCGCTGAGCCGACC</u>
^a RV: CYP154E1_M388	<u>GAACACGGTCGGCGTCGGCG</u>
Sequenzierungsprimer	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG

5.2 Molekular- und mikrobiologische Methoden

5.2.1 Agarosegelelektrophorese und Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wurden 2 µl der Probe mit 1 µl 5x OrangeG Probenpuffer und 2 µl ddH₂O vermischt und neben einem Größenstandard (GenRuler 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas)) auf ein Agarosegel (0,8 % (g/v) Agarose) in TAE Puffer versetzt mit 0,0001 % (g/v) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Trennung bei einer Spannung von 120 V innerhalb von 35 min. Die Visualisierung erfolgte mit einem UV-Transilluminator und die DNA-Konzentration wurde densitometrisch mit der Software GeneTools (Syngene) bestimmt.

5.2.2 Gelextraktion und Aufreinigung der DNA-Fragmente

Amplifizierte DNA oder mit Restriktionsenzymen verdaut DNA wurde direkt oder nach der Extraktion aus einem Agarosegel mit dem GeneJET Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution wurde mit 30-50 µl ddH₂O durchgeführt.

5.2.3 Enzymatischer Verdau und Ligation von DNA-Fragmenten

Plasmide und PCR-Produkte wurden mit Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific) verdaut. Wenn möglich wurde der Verdau mit zwei Endonucleasen simultan durchgeführt. Die Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 10-50 µl bei 37°C für 1-2 h pro µg DNA inkubiert. Die Enzyme wurden anschließend bei 80°C für 10 min deaktiviert und wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben aufgereinigt. Die Ligation folgte mit der T4 Ligase (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers. Es wurde ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:5 für die Ligation verwendet.

5.2.4 Konstruktion des rekombinanten Plasmids pET-28a(+)_CYP154F1

Das für CYP154F1 kodierende Gen wurde aus der genomischen DNA von *Thermobifida fusca* YX mit der PCR amplifiziert (Tabelle 14). Die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *EcoRI* wurde mit den aus Tabelle 13 verwendeten Oligonukleotiden eingefügt.

Tabelle 14. Reaktionsansatz der PCR zur Amplifizierung von *CYP154F1*

Komponente	Menge [µl]	Endkonzentration
Genomische DNA	1	50 ng
Sinn-Oligonukleotid (10 pmol/µl)	2,5	0,5 µM
Anti-Sinn-Oligonukleotid (10 pmol/µl)	2,5	0,5 µM
Desoxyribonukleosidtriphosphat (10 mM)	1	200 µM
5x Phusion HF-Puffer (+MgCl ₂)	10	
DMSO	1,5	3 %
Phusion-Pol. (2U/µl)	0,5	0,02 U/µl
Wasser	31	

Tabelle 15. Temperaturprogramm der PCR zur Amplifizierung von *CYP154F1*

Zyklusschritt	Temperatur (°C)		Zeit (min:s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	98		5:00	1
Denaturierung	98		00:10	25
Anlagerung	64		00:30	25
Elongation	72		00:40	25
Finale Elongation	72		05:00	1

Anschließend wurde der PCR-Ansatz wie in 5.2.2 beschrieben aufgereinigt und wie in 5.2.3 mit *NdeI* und *EcoRI* verdaut. Der Vektor pET-28a(+) wurde ebenfalls *NdeI* und *EcoRI* verdaut und wie in 5.2.2 gereinigt. Die Ligation von pET-28a(+) und dem *CYP154F1* erfolgte wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben.

5.2.5 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde nach der 'Round-the-horn (http://openwetware.org/wiki/'Round-the-horn_site-directed_mutagenesis; Mai 2016) oder nach einer modifizierten QuikChange® Methode mit dem Mutagenese Kit (Stratagene) durchgeführt.^[209] Für die PCR wurde die Phusion-DNA-Polymerase® verwendet.

'Round-the-horn site-directed mutagenesis

Die 'round-the-horn Methode wurde angewandt, wenn eine Position durch mehrere Aminosäuren ausgetauscht werden sollte, da das rückwärts Oligonukleotid (*reverse Primer*) keine Mutation beinhaltet und somit wiederverwendet werden konnte. Im Gegensatz zur QuikChange®-Mutagenese werden nicht komplementäre, an beiden Enden phosphorylierte Oligonukleotide verwendet. Die Phosphorylierung ist für die spätere 'blunt-end' Ligation notwendig.

Tabelle 16. Standardreaktionsansatz einer 'round-the-horn-PCR

Komponente	Menge [µl]	Endkonzentration
Matrize	1	1 pg – 10 ng
Sinn-Oligonukleotid (10 pmol/µl)	2,5	0,5 µM
Anti-Sinn-Oligonukleotid (10 pmol/µl)	2,5	0,5 µM
Desoxyribonukleosidtriphosphat (10 mM)	1	200 µM
5x Phusion HF-Puffer (+MgCl ₂)	10	
DMSO	1,5	3 %
Phusion-Pol. (2U/µl)	0,5	0,02 U/µl
Wasser	31	

Tabelle 17. Temperaturprogramm einer 'round-the-horn-PCR.

Zyklusschritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	00:30	1
Denaturierung	98	00:10	25
Anlagerung	50-72	00:30	25
Elongation	72	03:00	25
Finale Elongation	72	07:00	1

Nach der PCR folgte eine Reinigung der DNA mit GeneJET Gel Extraction Kit wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben. Anschließend wurde die parentale, methylierte DNA mit FastDigest® *DpnI* (Thermo Scientific) verdaut. Dazu wurden 8,5 µl des Eluats mit 0,5 µl des Enzyms und 1 µl des FastDigest® 10x Puffer für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde 9,5 µl 2x rapid ligation buffer und 0,5 µl T4 (2,5 Weiss U) hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µl RbCl-kompetente *E. coli*-DH5α-Zellen wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes transformiert. Die Mutation wurde durch Sequenzierung bei GATC Biotech bestätigt.

Modifizierte QuikChange® Mutagenese ^[209]

Für die modifizierte QuikChange® Mutagenese wurden 2 komplementäre Oligonukleotide erstellt, die die Mutation mittig tragen. Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes entspricht dem aus Tabelle 16 allerdings ohne die Oligonukleotide. Der Reaktionsansatz wurde halbiert und der Sinn-Oligonukleotid bzw. der Anti-Sinn-Oligonukleotid hinzugefügt. Nach 5 Zyklen des Temperaturprogramms von Tabelle 17 wurden die beiden Reaktionsansätze mit den verschiedenen Oligonukleotiden zusammengegeben und für weitere 18 Zyklen inkubiert. Anschließend wurde die parentale, methylierte DNA mit FastDigest® *DpnI* (Thermo Scientific) verdaut. Dazu wurden 8,5 µl des Eluats mit 0,5 µl des Enzyms und 1 µl des FastDigest® 10x Puffer für 20-30 min bei 37°C inkubiert. 100 µl RbCl-kompetente *E. coli*-DH5α-Zellen wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes transformiert. Die Mutation wurde durch Sequenzierung bei GATC Biotech bestätigt.

5.2.6 Anzucht der *E. coli*-Zellen

Für die Kultivierung der *E. coli*-Zellen wurden Übernachtskulturen mit 5 ml LB-Medium angesetzt. Je nach Resistenz des zuvor transformierten Plasmids wurden 30 µg/ml Kanamycin oder 100 µg Ampicillin gegeben und mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 180 rpm.

5.2.7 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt. Dazu wurde ein 0,5 l-Kolben mit 50 ml LB-Medium mit 0,5 ml einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zur einer O.D.₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Danach wurden die Zellen für 15 min auf Eis gelagert und anschließend bei 3200 g bei 4°C 10 min lang zentrifugiert. Mit 20 ml der TfbI-Lösung wurden die Zellen resuspendiert und wieder für 15 min auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde anschließend wieder zentrifugiert (3200 g, 4°C, 10 min) und das Zellpellet in 2 ml TfbII-Lösung resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.2.8 Transformation von *E. coli*-Zellen

0,5–1 µl Plasmid (50–300 ng) bzw. 10 µl Ligationsansatz wurden zu 20-100 µl chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 1-3 min durchgeführt. Anschließend wurde 500 µl LB-Medium zugegeben und für

60 min bei 37°C und 600 rpm inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf einer LB-Agarplatte mit einem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus einer mit *E. coli*-DH5 α -Zellen innokulierten Übernachtskultur isoliert. Dazu wurde das ZR Plasmid MiniPrep™-Classic Kit (ZymoResearch) verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Elution des Plasmids erfolgte allerdings mit 30 μ l ddH₂O.

5.2.10 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

P450-Varianten

Die Expression der P450-Varianten wurden in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Dazu wurde TB-Medium (50 ml in 500 ml Erlenmeyerkolben bzw. 400 ml in einem 2 l Erlenmeyerkolben) mit 1 % (v/v) einer Übernachtskultur mit den entsprechenden *E. coli*-Zellen inokuliert und mit Kanamycin (30 μ g/ml) versetzt. Nach Inkubation bei 37°C und 180 rpm bis zur einer O.D.₆₀₀ von 0,6-1 wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von 0,2 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Zusätzlich wurde FeSO₄ (0,1 mM) und 5-Aminolävulinsäure (0,5 mM) hinzugegeben und für 16-24 h bei 25°C und 140 rpm inkubiert.

Glucose-Dehydrogenase (GDH), Flavodoxin Reduktase (FdR), Flavodoxin (YkuN)

Die Expression wurde in gleicher Weise wie für die P450-Varianten durchgeführt, allerdings wurde Ampicillin (100 μ g/ml) als Selektionsantibiotika verwendet. Außerdem wurde das Medium nicht mit FeSO₄ und 5-Aminolävulinsäure versetzt.

5.2.11 Zellernte und Zellaufschluss

Nach der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation (4°C, 4.000–8.000 g, 20 min) geerntet und bei -20°C oder direkt zur weiteren Verwendung in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) resuspendiert und mit Phenylmethylsulfonylfluorid (100 μ M) versetzt. Im Fall von GDH wurde zusätzlich 500 mM NaCl zugegeben. Anschließend wurden die Zellen im Eisbad per Ultraschall aufgeschlossen (3x 2 min mit einminütiger Pause zwischen den Zyklen). Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde die Suspension bei 58.545 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert.

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Reinigung der Proteine

Die Proteinreinigung erfolgte mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie. Dazu wurde eine 10 ml Polypropylen-Säule mit Ni-NTA Superflow (Quiagen) gepackt und mit 3 Säulenvolumen des Bindungspuffers (50 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl) äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung zwei Mal aufgetragen. Danach wurde mit 5 Säulenvolumen des Waschpuffers (20 mM Imidazol, 50 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl) gewaschen. Das Protein wurde mit dem Bindepuffer mit 250 mM Imidazol eluiert. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration bei 3.500 g und 4 °C auf 1 ml konzentriert (Vivaspin (Turbo) 15, Ausschlussgrenze 10-30 kDa, Sartorius). Das

Imidazol wurde mittels Größenausschlusschromatographie (*size-exclusion chromatography* (SEC)) über eine Sephadex-Säule (PD-10 Desalting Columns, G-25, GE Healthcare) entfernt. Dazu wurde mit 4 Säulenvolumen des Puffers (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerin) äquilibriert. Danach wurde 1 ml der Proteinlösung aufgetragen und mit 1,5 ml eluiert.

5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Proteine wurde mit Hilfe der SDS-PAGE wie von Laemmli *et al.* beschrieben durchgeführt.^[210] Hierzu wurden die Proteinproben einer definierten Konzentration sowie Zelllysate mit einem äquivalenten Volumen von 2x SDS-Probenpuffer gemischt. *E. coli*-Ganzzellprobenpellets wurden mit einem Volumen von 50 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Ganzzellprobenpellets wurden aus ein definiertes Volumen (Formel 1) der *E. coli*-Zellkultur durch Zentrifugation (12.000 x g, 5 min, RT) erstellt. Die resultierende Proteinkonzentration liegt nach Zugabe von 50 µl 1x SDS-Probenpuffer bei ungefähr 1 µg µl⁻¹.

$$Vol [\mu l] = \frac{0,25}{OD_{600}} \times 1000 \quad (1)$$

OD₆₀₀= Optische Dichte der Zellkultur bei 600 nm

Die Proteinproben wurden bei 95°C für 10 min inkubiert und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (4 % Sammelgel, 12,5 % Trenngel) gegeben. Als Proteinstandard wurde 6 µl von „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“ (Thermo Scientific) verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1x SDS-Laufpuffer mit 10 mA pro Gel für die Fokussierung im Sammelgel durchgeführt. Für die Trennung der Proteine im Trenngel wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie Brilliant blue für 30 min gefärbt und anschließend über Nacht mit der Entfärbelösung entfärbt.

5.3.3 Verdau des His-getaggen CYP154F1 (His-tfu_1748) mit Thrombin

Die Endopeptidase Thrombin wurde für die Entfernung des N-terminalen His₆-Tag von CYP154F1 (His-tfu_1748) verwendet. Dies war möglich, da der Expressionsvektor pET-28a(+) eine Thrombin-Schnittstelle zwischen dem His-Tag und der *NdeI* Restriktionsstelle besitzt. Das kommerziell erhältliche Thrombin Cleavage Capture Kit (Novagen) wurde dafür nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden 10 mg CYP154F1 (His-tfu_1748), 1 ml 10x Puffer, 5 U Thrombin in einem Gesamtvolumen von 10 ml ddH₂O gegeben und 16 h bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde der abgeschnittene His-Tag und ungeschnittenes Protein durch Nickel-Affinitätschromatographie entfernt. Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie wurde das Thrombin entfernt.

5.3.4 Kristallisation von CYP154F1

Die Kristallisationsexperimente wurden nach der Dampfdiffusionmethode (*sitting drop*) bei 12 °C durchgeführt und das Prinzip des *sparse matrix sampling*^[211] angewandt. Dazu wurden zuerst beim initialen Screening in 96-Well Platten (Corning) verschiedene kommerzielle Kristallisation-Kits

(Tabelle 18) getestet, um geeignete Bedingungen zu finden. 50 µl dieser Lösungen aus den Screening-Kits wurden in den Reservoiren gegeben. Jedes dieser 96 Reservoire ist mit 3 Linsen ausgestattet, worauf jeweils 100 nl Proteinlösung verschiedener Konzentration mit Hilfe eines Pipettierroboters (NT8, Formulatrix) aufgetragen wurde. Die Proteinlösungen wurden mit dem gleichen Volumen aus dem jeweiligen Reservoir verdünnt. In regelmäßigen Intervallen wurde der Kristallisationsverlauf beobachtet.

Das *fine screening* wurde in 24-Well CrysChem Platten (Hampton Research) und eine Tropfengröße von 3 µl durchgeführt. 300 µl des Präzipitans wurden dazu in dem Reservoir gegeben und 1,5 µl dieser Lösung mit 1,5 µl der Proteinlösung (10-20 mg/ml) auf die jeweilige Linse gegeben. Bei der Verwendung des Additiv-Kits (Additiv Screen 1-11, Molecular Dimensions) wurden 1,5 µl der Proteinlösung, 1,25 µl der Reservoirolösung und 0,25 µl des Additivs auf der Linse vermengt.

Tabelle 18. Liste der verwendeten, kommerziellen Screening-Kits. Die fettgedruckten Kits wurden zusätzlich mit der P450-Version ohne His-Tag (CYP154F1-Thr) getestet.

Screening-Kit	Hersteller
The MPD Suite, JCSG Core III Suite, JCSG Core IV Suite, The Cyros Suite	Quiagen
The PEGs Suite, The PEGs II Suite, The MPD Suite, MbClass Suite, MbClass II Suite , The pHClear Suite, The PACT Suite, The JCSG Suite , The CompAS Suite , The Protein Complex Suite , The MPD Suite	
Crystal Screen I, Crystal Screen II	Hampton Research
Crystallization Basic Kit for Proteins	Sigma-Aldrich
MemGold, MemPlus, MemSys, MIDAS , The PGA Screen	Molecular Dimensions Ltd.

5.3.5 Bestimmung der P450-Konzentration

Die Konzentrationen der verwendeten P450-Varianten wurden durch CO-Differenzspektroskopie bestimmt.^[4,5] Dazu wurde die Proteinlösung in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) auf 1900 µl in eine Küvette verdünnt. 950 µl wurden davon in einer weiteren Küvette gegeben und mit Kohlenstoffmonoxid begast. Danach wurden die Küvetten in dem Zweistrahlphotometer platziert und ein Nullabgleich vorgenommen. Dann wurde das Hämeisen durch Zugabe von 50 mM Natriumdithionit in beiden Küvetten reduziert und fünf hintereinander folgende CO-Differenzspektren zwischen 400 und 500 nm aufgenommen. Die P450-Konzentration wurde nach Formel 2 berechnet.

$$c(P450) = \frac{\Delta A_{450-490} \cdot \text{Verdf.}}{\epsilon(450) \cdot d} \quad (2)$$

$\Delta A_{450-490}$ = Differenz der Absorption bei 450 und 490 nm
 ϵ = Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{450} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 Verdf. = Verdünnungsfaktor
 d = Küvettenschichtdicke = 1 cm

5.3.6 Bestimmung der volumetrischen GDH-Aktivität

In den Umsetzungen wurde zur Regenerierung des Kofaktors NADP⁺ Glucose und GDH zugegeben. Die Aktivität der GDH wurde durch die NADPH-Bildung und die dadurch resultierende Absorptionsänderung bei 340 nm am Photometer bestimmt. Dazu wurden in einer Küvette 100 mM Glucose, 100 µl verdünnte Proteinlösung und Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) zu einem Gesamtvolumen von 1 ml gegeben. Nach Zugabe von 0,1 mM NADP⁺ wurde die Messung gestartet und die Absorptionsänderung über 3 min verfolgt. Für die Berechnung der volumetrischen Aktivität wurde die Anfangsabsorptionsänderung genommen und nach Formel 3 berechnet.

$$V = \frac{\Delta A_{340} \cdot \text{Verdf.}}{\varepsilon \cdot d} \quad (3)$$

V = volumetrische Aktivität [U ml⁻¹]
 Verdf = Verdünnungsfaktor
 ΔA_{340} = Absorptionsänderung bei 340 nm [min⁻¹]
 d = Küvettschichtdicke = 1 cm
 ε = NADPH Extinktionskoeffizient bei 340 nm
 $(\varepsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})$

5.3.7 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die kinetischen Parameter für die Geraniol-Umsetzung mit den CYP154F1-Varianten wurden in einem Reaktionsvolumen von 125 µl in Kaliumphosphat (100 mM, pH 7,5) bei 25°C und 600 rpm bestimmt. Dazu wurden die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Geraniolkonzentrationen (20-2800 µM) bestimmt. Die Reaktionen enthielten außerdem 1 µM gereinigtes P450, 1 µM FdR, 10 µM YkuN, 600 U/ml Katalase, 200 µM NADPH, 20 mM Glucose und 5 U/ml GDH zur Kofaktorregenerierung. Die Reaktion wurde nach 10-90 min durch Zugabe von 100 µl und darauffolgendem vortexen gestoppt. Zur Quantifizierung wurde 200 µM 1,8-Octandiol als interner Standard zugegeben. Durch Zentrifugation wurden die Phasen getrennt und die organische Phase mittels GC/MS analysiert. Die Experimente wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die Daten wurden nach der nichtlinearen Regression basierend auf der Michaelis-Menten-Gleichung mit der Software "OriginPro 9G" (OriginLab Corporation) angepasst, um die K_M und K_{cat} -Werte zu bestimmen. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter für die Umsetzung von (*E*)-Stilben (**1a**) mit den CYP154E1-Varianten wurde in gleicherweise durchgeführt. Folgende Änderungen wurden unternommen: Die (*E*)-Stilbenkonzentration betrug 10–1000 µM und die Umsetzung wurde nach 4 bis 40 min gestoppt. Zur Quantifizierung wurden 300 µM Flavon als interner Standard zugegeben.

Die Dissoziationskonstante (K_D) wurde anhand der spektralen Absorptionsänderung von P450-Enzymen bestimmt, welche durch eine Substratbindung induziert wird. Für die Messungen wurde ein UV/VIS Zweistrahlphotometer (Lambda 35, PerkinElmer) und zwei Doppelkammer-Quarzküvetten (Helma) verwendet. In einer Kammer von jeder Küvette wurde 800 µl Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) mit 1 µM P450 gegeben und in die andere Kammer jeweils nur 800 µl Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5). (*E*)-Stilbene gelöst in DMSO wurde in kleinen Aliquots (0,5-2 µl) zu der P450-enthaltenen Kammer der Probenküvette gegeben. In der Referenzküvette wurde die Stilbenlösung hingegen in die Kammer ohne P450 gegeben. Die

resultierende Absorptionsänderung wurde in einem Bereich zwischen 350 und 500 nm aufgenommen. Die Zugabe der Stilbenlösung und Messung wurde bis zur Substratsättigung wiederholt. Die K_D -Werte wurde durch anpassen der Daten an der nachfolgenden hyperbolischen Gleichung berechnet:

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max} \times [S]}{K_D + [S]} \quad (4)$$

ΔA = Differenz zwischen dem Minimum und Maximum der Absorption

$\Delta A_{\max}$ = Absorptionsmaximum

$[S]$ = Substratkonzentration

5.3.8 Bestimmung der Kopplungseffizienz

Die Effizienz der Kopplung zwischen den Redoxpartner YkuN/FdR und den CYP154F1-Varianten wurde in einem Reaktionsvolumen von 125 μ l in Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) bei 25°C und 600 rpm bestimmt. Die Reaktionen enthielten 1 μ M gereinigtes P450, 1 μ M FdR, 10 μ M YkuN, 2 mM Geraniol und 1 mM NADPH. Nach 17 h wurde 100 μ l Ethylacetat zugegeben und 5 min gevortext. Zur Quantifizierung wurde 200 μ M 1,8-Octandiol als interner Standard zugegeben. Durch Zentrifugation wurden die Phasen getrennt und die organische Phase mittels GC/MS analysiert. Die Menge des entstandenen Produkts wurde im Verhältnis zu dem eingesetzten NADPH gesetzt und dadurch die Kopplungseffizienz berechnet. Die Werte sind als Mittelwerte angegeben und basieren auf dreifach durchgeführten Experimenten.

5.3.9 Screening der Substratbibliothek

Die Reaktionen für das Screening wurde in einem Endvolumen von 500 μ l Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) durchgeführt. Die Reaktionen enthielten 1 μ M CYP154F1, 1 μ M FdR, 10 μ M YkuN, 600 U/ml Katalase, 200 μ M NADP⁺, 20 mM Glucose und 5 U/ml GDH zur Kofaktorregenerierung. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei 25°C inkubiert und durch Zugabe von Ethylacetat oder Diethylether und anschließendem Vortexen gestoppt. Um die Extraktion von basischen Verbindungen (**38, 89, 90, 91, 95, 96**) zu ermöglichen, wurde Natriumhydroxidlösung (1 M) bis zu einem pH-Wert von ungefähr 11 zugeben (Liste aller getesteten organischen Verbindungen siehe Tabelle 19). Im Fall von sauren Verbindungen (**1-11, 14, 65, 67, 68, 69, 72, 75, 77, 78, 79**) wurde Salzsäure (1 M) bis ein pH-Wert von ungefähr 2 erreicht wurde zugegeben. Bei den Verbindungen **1-3, 16-20, 26** wurde eine Spatelspitze NaCl hinzugegeben, um die Extraktion zu ermöglichen. Durch Zentrifugation wurden die Phasen getrennt und die organische Phase mittels GC/MS analysiert.

Die Carbonsäuren (**1-11, 14, 65, 67, 68, 69, 72, 75, 78, 79**) wurden 3-mal mit 400 μ l Diethylether extrahiert und die kombinierten organischen Phasen nach der Trocknung über MgSO₄ evaporiert. Der Rückstand wurde mit dem Silylierungsreagenz *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) aufgenommen und vor der Analyse mittels GC/MS 1-2 h bei 60°C in einem GC-Vial erhitzt. Die Experimente zum Substratscreening wurden in zweifacher Ausführung durchgeführt. Die

Diethyletherextrakte von **95** und **97** wurden evaporiert, mit Methanol aufgenommen und mittels LC/MS analysiert.

5.3.10 Reaktionen im analytischen Maßstab

Die Reaktionen im analytischen Maßstab wurde in einem Endvolumen von 125 µl Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) durchgeführt. Die Reaktionen enthielten 1 µM P450, 1 µM FdR, 10 µM YkuN, 600 U/ml Katalase, 200 µM NADP⁺, 20-60 mM Glucose und 5 U/ml GDH zur Kofaktorregenerierung. Falls nicht anders angegeben, wurde die Reaktionslösung bei 25°C und 600 rpm für 16 h inkubiert. Für die Umsetzungen von Stilbenen mit Substratkonzentrationen von 10-20 mM wurde 48 mM Methyl-β-Cyclodextrin als Lösungsvermittler zugegeben. Die Reaktionen wurden mit 100 µl Ethylacetat und Vortexen gestoppt. Für Umsetzungen von der Stilbene **1a-1d** und **2a** wurde Flavon (300-3000 µM) als interner Standard zugegeben. Für die Umsetzungen von Geraniol wurde 1,8-Ocandiol (200 µM) als interner Standard zugegeben.

Durch Zentrifugation wurden die Phasen getrennt und die organische Phase mittels GC/MS analysiert.

5.3.11 Reaktionen im präparativen Maßstab

Die Umsetzungen von (*E*)-Stilben (**1a**), (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**), (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) und Pinosylvlin (**1d**) im präparativen Maßstab wurden wie die Reaktionen im analytischen Maßstab durchgeführt, allerdings in einem Rundhalskolben und mit einem Reaktionsvolumen von 10 ml. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung inkubiert (8-22 h). Anschließend wurde die Lösung mit Ethylacetat (3x 10 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und bis zur Trockene abrotiert.

Umsatz von (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) mit der Mutante L234Q/I238V/G239A

(*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (2c): 10 mM (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) wurde mit 1 µM der Mutante L234Q/I238V/G239A in Anwesenheit von 48 mM Methyl-β-Cyclodextrin in 20 h vollständig umgesetzt. Die anschließende Aufreinigung mittels Kieselgelsäule (DCM/EtOAc = 1:1 v/v) ergab eine isolierte Ausbeute von 87 % (18,4 mg). Die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten der Verbindung überein.^[212,213]

¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO) (Anhang, Abbildung 64): δ 6.72 (ddd, *J* = 8.0, 2.4, 1.1 Hz, 1H), 6.82 – 6.87 (m, 2H), 6.97 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.00 – 7.04 (m, 2H), 7.10 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 7.16 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.40 – 7.48 (m, 2H), 8.36 (br, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO) (Anhang, Abbildung 65): δ 113.6, 115.0, 116.4, 118.6, 126.6, 128.7, 129.2, 130.0, 130.4, 140.3, 158.2, 158.5, 206.2, 206.2, 206.2, 206.2, 206.2, 206.2. MS (EI⁺, 70 eV) *m/z* (%): 213 (15), 212 ([M]⁺, 100), 211 (27), 195 (15), 193 (12), 183 (12), 165 (32), 153 (10), 82 (14).

Umsatz von Pinosylvin (1d) mit der Mutante L234Q/I238V/G239A

Resveratrol (2d): 1 mM Pinosylvin (**1d**) wurde mit 1 μ M der Mutante L234Q/I238V/G239A in 20 h vollständig umgesetzt. Die anschließende Aufreinigung mittels Kieselgelsäule (DCM/EtOAc = 1:1 v/v) ergab eine isolierte Ausbeute von 83 % (1,9 mg). Die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten der Verbindung überein.^[214]

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) (Anhang, Abbildung 66): δ 6.15 (t, J = 2.2 Hz, 3H), 6.44 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.76 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) (Anhang, Abbildung 67): δ 102.6, 105.8, 116.5, 127.0, 128.8, 129.4, 130.4, 141.3, 158.4, 159.7. MS (EI⁺, 70 eV) m/z (%): 229 (15), 228 ([M]⁺, 100), 227 (24), 211 (19), 165 (10), 157 (12), 153 (11), 152 (12), 115 (13), 91 (11), 77 (11), 76 (15), 69 (10), 55 (13).

Umsatz von (E)-2-Hydroxystilben (1b) mit der Mutante I238A/G239A

(E)-2,4'-Dihydroxystilben (2b): 10 mM (E)-2-Hydroxystilben (**1b**) wurde mit 1 μ M der Mutante I238A/G239A in Anwesenheit von 48 mM Methyl- β -Cyclodextrin in 20 h vollständig umgesetzt. Die anschließende Aufreinigung mittels Kieselgelsäule (Hexan/EtOAc = 4:1) ergab eine isolierte Ausbeute von 79 % (16,8 mg). Die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten der Verbindung überein.^[215]

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) (Anhang, Abbildung 60): δ 6.75 – 6.82 (m, 4H), 7.01 – 7.04 (m, 1H), 7.06 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.35 – 7.39 (m, 2H), 7.49 (dd, J = 7.7, 1.6 Hz, 1H). ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) (Anhang, Abbildung 61): δ 116.4, 116.5, 120.8, 121.9, 126.3, 127.1, 128.6, 128.9, 129.2, 131.3, 155.8, 158.1. MS (EI⁺, 70 eV) m/z (%): 212 ([M]⁺, 100), 211 (30), 165 (25)

(E)-2,4',5-Trihydroxystilben (4b): 1 mM (E)-2-Hydroxystilben (**1b**) wurde mit 1 μ M der Mutante I238A/G239A in 8 h vollständig umgesetzt. Die anschließende Aufreinigung mittels Kieselgelsäule (DCM/EtOAc = 4:1 v/v) ergab eine isolierte Ausbeute von 75 % (1,7 mg). Die analytischen Daten stimmten mit den Literaturdaten der Verbindung überein.^[216]

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) (Anhang, Abbildung 62): δ 6.52 (dd, J = 8.6, 2.9 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.70 – 6.82 (m, 2H), 6.92 – 7.07 (m, 2H), 7.23 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 7.30 – 7.42 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) (Anhang, Abbildung 63) δ 112.7, 115.9, 116.4, 117.4, 121.8, 126.9, 128.7, 129.1, 131.1, 149.0, 151.4, 158.1. MS (EI⁺, 70 eV) m/z (%): 229(15), 228 ([M]⁺,100), 227 (15), 211 (16), 199 (12), 181 (18), 165 (10), 153 (12), 152 (12), 115 (15), 107 (11), 77 (11) 55 (12).

5.3.12 Synthese der Stilbenoide (in Kooperation mit Dragutin Antovic)

Die Stilbene Pinosylvin (**1d**), (E)-4-Hydroxystilben (**2a**) und (E)-Stilben (**1a**) wurden kommerziell erworben (Sigma-Aldrich). (E)-2-Hydroxystilben (**1b**), (E)-3-Hydroxystilben (**1c**) und (E)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) wurden in einer Heck-artigen Kupplungsreaktion aus dem entsprechenden Iodphenol und dem Styrolderivat, wie von Singh *et al.* beschrieben, synthetisiert.^[217]

Allgemeine Vorgehensweise für die Synthese der Stilbenderivate: PdCl_2 (0,04 äq.), PPh_3 (0,04 äq.), das Styrolderivat (1,3 äq.) und das entsprechende Iodphenol (1 äq.) unter Stickstoff in einem Schlenkkolben mit Septum gegeben. Anschließend wurde Triethylamin (2,3 äq.) zugegeben und für 18 h bei 80°C gerührt. Nach Abkühlung auf RT wurde eine wässrige HCl-Lösung (1 N, 6 ml) und dH_2O (10 ml) zugegeben. Die Suspension wurde mit Dichlormethan (3x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt.

(E)-2-Hydroxystilben (1b): Nach der allgemeinen Vorgehensweise wurden 13 mg PdCl_2 (0,07 mmol), 38 mg PPh_3 (0,07 mmol), 0,3 ml Styrol (2,6 mmol), 438 mg (2 mmol) 2-Iodphenol und 0,64 ml (4,6 mmol) Triethylamin eingesetzt. Das rohe Produkt wurde auf Celete® absorbiert und mittels Kieselgelsäule (DCM) aufgereinigt und ergab eine isolierte Ausbeute von 68 % (265 mg) (E)-2-Hydroxystilben (**1b**).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) (Anhang, Abbildung 52): δ 5.02 (s, 1H), 6.82 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 6.93 – 7.00 (m, 1H), 7.09 – 7.20 (m, 2H), 7.24 – 7.31 (m, 1H), 7.34 – 7.42 (m, 3H), 7.52 – 7.57 (m, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) (Anhang, Abbildung 53): δ 116.1 (CH), 121.3 (CH), 123.1 (CH), 124.8 (C_{quat}), 126.7 (CH), 127.4 (CH), 127.8 (CH), 128.8 (CH), 130.3 (CH), 137.7 (C_{quat}), 153.1 (C_{quat}). MS (EI^+ , 70 eV) m/z (%): 197 (15), 196 ($[\text{M}]^+$, 100), 195 (50), 181 (13), 179 (13), 177 (11), 167 (20), 165 (19), 152 (12).

(E)-3-Hydroxystilben (1c): Nach der allgemeinen Vorgehensweise wurden 13 mg PdCl_2 (0,07 mmol), 38 mg PPh_3 (0,07 mmol), 0,3 ml Styrol (2,6 mmol), 438 mg (2 mmol) 2-Iodphenol und 0,64 ml (4,6 mmol) Triethylamin eingesetzt. Das rohe Produkt wurde in n-Hexan/Ethylacetat umkristallisiert und ergab eine Ausbeute von 62 % (244 mg) (E)-3-Hydroxystilben (**1c**).

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) (Anhang, Abbildung 54): δ 4.75 (br, 1H), 6.76 (ddd, $J = 8.0$ Hz, 2.5 Hz, 0.9 Hz, 1H), 7.00 – 7.02 (m, 1H), 7.06 – 7.15 (m, 3H), 7.22 – 7.32 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.49 – 7.55 (m, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) (Anhang, Abbildung 55): δ 113.1 (CH), 114.8 (CH), 119.6 (CH), 126.7 (CH), 127.9 (CH), 128.3 (CH), 128.8 (CH), 129.3 (CH), 130.0 (CH), 137.3 (C_{quat}), 139.2 (C_{quat}), 155.8 (C_{quat}). MS (EI^+ , 70 eV) m/z (%): 197 (15), 196 ($[\text{M}]^+$, 100), 195 (49), 181 (24), 179 (26), 178 (27), 177 (34), 176 (15), 167 (32), 166 (13), 165 (37), 152 (22).

(E)-4,4'-Diacetoxystilben. Nach der allgemeinen Vorgehensweise wurden 26 mg PdCl_2 (0,14 mmol), 76 mg PPh_3 (0,14 mmol), 842 mg 4-Acetoxystyrol (2,6 mmol), 880 mg (4 mmol) 2-Iodphenol und 1,29 ml (9,2 mmol) Triethylamin eingesetzt. Das rohe Produkt wurde auf Celete® absorbiert und mittels Kieselgelsäule und 7 Säulenvolumen (DCM/n-Hexan = 1:1 v/v) aufgereinigt. Danach wurde das Laufmittel zu Ethylacetat gewechselt und mit zwei Säulenvolumen das Produkt eluiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand dreimal mit Ethylacetat gewaschen. Es wurde eine isolierte Ausbeute von 23 % (270 mg) von (E)-4,4'-Diacetoxystilben erhalten.

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 300 MHz) (Anhang, Abbildung 56): δ 2.27 (s, 6H), 7.11 – 7.19 (m, 4H), 7.24 (s, 2H), 7.60 – 7.67 (m, 4H). ^{13}C NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 75 MHz) (Anhang, Abbildung 57): δ 20.9 (CH₃), 122.1 (CH), 127.4 (CH), 127.6 (CH), 134.7 (C_{quat}), 149.9 (C_{quat}), 169.2 (C_{quat}). MS (EI⁺, 70 eV) m/z (%): 297 (2), 269 ([M]⁺, 11), 254 (25), 213 (16), 212 (100), 211 (14), 165 (19), 153 (9), 152 (9).

(*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (4a): In einem Mikrowellenreaktionsgefäß wurde (*E*)-4,4'-Diacetoxystilben (90 mg, 0,3 mmol, 1 äq.) und Natriumhydroxid (90 mg, 2,25 mmol, 7,5 äq.) zu einer 1,4-Dioxan/Wasser Lösung (5 ml, 1:1, v/v) gegeben. Die Suspension wurde auf 100°C erhitzt für 20 min Mikrowellenstrahlung ausgesetzt. Nach Abkühlung auf RT wurde eine wässrige HCl-Lösung (1 N, 25 ml) zugegeben und das Präzipitat filtriert und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum ergab sich eine Ausbeute von 90 % (55 mg) von (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**).

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 300 MHz) (Anhang, Abbildung 58): δ 6.78 – 6.85 (m, 4H), 6.96 (s, 2H), 7.35 – 7.41 (m, 4H), 8.37 (s, 2H). ^{13}C NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 75 MHz) (Anhang, Abbildung 59): 116.3 (CH), 126.5 (CH), 128.3 (CH), 130.5 (C_{quat}), 157.7 (C_{quat}). MS (EI⁺, 70 eV) m/z (%): 213 (21), 212 ([M]⁺, 100), 211 (21), 207 (36), 197 (23), 177 (22), 165 (42), 89 (24), 77 (26), 73 (40), 63 (25), 51 (24).

5.4 Analytische Methoden

5.4.1 GC/MS-Analyse

Die Produktanalyse via GC/MS erfolgte mit einem QP-2010 Plus (Shimadzu) und einer FS-Supreme-5ms Säule (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , Chromatographie Service GmbH) mit Helium als Trägergas. Die Injektortemperatur betrug 250 bis 300°C und die Interfacetemperatur 285 bis 300°C während die Ionenquellentemperatur 200°C betrug. Es wurde der SIM- und Scan-Modus in einem Bereich von 40-400 m/z gemessen. Die quantitative Analyse wurde über den SIM-Modus durchgeführt. Die Quantifizierung des Umsatzes der Stilbenoide **2b-d** und **4b** basiert auf der absoluten Substratkonzentration, die über eine Kalibrierung mit einem internen Standard bestimmt worden ist. Die Quantifizierung von (*E*)-8-Hydroxygeraniol, (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) und (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) erfolgte mit Hilfe einer zuvor gemessenen Kalibrationskurve von entsprechenden authentischen Proben.

5.4.2 LC/MS-Analyse

Die Produktanalyse via LC/MS erfolgte mit einem Prominence/LC/MS 2020 (Shimadzu) und einer Chromolith®-Säule (100 mm x 4,6 mm, RP-18, Merck). Die Flussrate betrug 1 ml/min und die Säulentemperatur 30°C. Ein Lösungsmittelgradient aus 0,1 % Ameisensäure und Methanol wurde verwendet. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte im dualen Ionisierungsmodus (Elektrospray-Ionisation (ESI) und chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). Die Heizblocktemperatur der ESI-Quelle betrug 400°C, die Desolvatisierungstemperatur 275°C, die Schnittstellenspannung (Interface) 4,5 kV. Das Zerstäubergas wurde auf einen Fluss von 1,5 l/min und das Trocknungsgas auf einen Fluss von 15 l/min eingestellt. Der positive und negative Scanmodus detektierte in einem Bereich von 200-500 m/z .

5.4.3 NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Analysen wurden mit dem Spektrometer Avance III (Bruker) bei einer Messfrequenz von 300 oder 600 MHz bzw. 150 MHz durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind relativ zu dem internen Standard TMS oder zum jeweiligen Lösungsmittelsignal angegeben. Die Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Die NMR-Spektren wurden im Analytik-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Lamb, D. C., Lei, L., Warrilow, A. G. S., Lepesheva, G. I., Mullins, J. G. L., Waterman, M. R., Kelly, S. L. The first virally encoded cytochrome P450, *J. Virol.* **2009**, 83, 8266–8269.
- [2] Ortiz de Montellano, Paul R. (Hrsg.) Cytochrome P450. *Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Springer International Publishing, Cham, **2015**.
- [3] Pleiss, J., "Cytochrome P450 Engineering Database", zu finden unter <https://cyped.biocatnet.de/>, **2017**.
- [4] Omura, T., Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 2370–2378.
- [5] Omura, T., Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 2379–2385.
- [6] Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., Dawson, J. H. Heme-Containing Oxygenases, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2841–2888.
- [7] Guengerich, F. P., Munro, A. W. Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 17065–17073.
- [8] McIntosh, J. A., Farwell, C. C., Arnold, F. H. Expanding P450 catalytic reaction space through evolution and engineering, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 126–134.
- [9] Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains, *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, 1770, 330–344.
- [10] Masayuki Katagiri, B. N. Ganguli and I. C. Gunsalus A soluble cytochrome P450 functional in methylene hydroxylation, *J. Biol. Chem.* **1968**, 3543–3546.
- [11] Mitani, F. Cytochrome P450 in adrenocortical mitochondria, *Mol. Cell Biochem.* **1979**, 24, 21–43.
- [12] Hawkes, D. B., Adams, G. W., Burlingame, A. L., Ortiz de Montellano, Paul R, Voss, J. J. de Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 27725–27732.
- [13] Narhi, L. O., Fulco, A. J. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 7160–7169.
- [14] Narhi, L. O., Fulco, A. J. Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 6683–6690.

-
- [15] Sligar, S. G. Coupling of spin, substrate, and redox equilibriums in cytochrome P450, *Biochemistry* **1976**, *15*, 5399–5406.
- [16] Sligar, S. G., Gunsalus, I. C. Proton coupling in the cytochrome P-450 spin and redox equilibriums, *Biochemistry* **1979**, *18*, 2290–2295.
- [17] Kaim, W., Schwederski, B., Bioanorganische Chemie. *Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen*, 4. Aufl., Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, s.l., **2005**.
- [18] Rittle, J., Green, M. T. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics, *Science (New York, N.Y.)* **2010**, *330*, 933–937.
- [19] Groves, J. T. High-valent iron in chemical and biological oxidations, *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 434–447.
- [20] Groves, J. T., McClusky, G. A. Aliphatic hydroxylation via oxygen rebound. Oxygen transfer catalyzed by iron, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 859–861.
- [21] Ogliaro, F., Harris, N., Cohen, S., Filatov, M., Visser, S. P. de, Shaik, S. A model “rebound” mechanism of hydroxylation by cytochrome P450, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8977–8989.
- [22] Paul R. Ortiz de Montellano, Substrate Oxidation by Cytochrome P450 Enzymes in *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg.: Ortiz de Montellano, Paul R.), Springer International Publishing, Cham, **2015**, 111–176.
- [23] Jerina, D. M., Daly, J. W. Arene Oxides, *Science* **1974**, *185*, 573–582.
- [24] Lovern, M. Identification of benzene oxide as a product of benzene metabolism by mouse, rat, and human liver microsomes, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1695–1700.
- [25] Bathelt, C. M., Ridder, L., Mulholland, A. J., Harvey, J. N. Mechanism and structure–reactivity relationships for aromatic hydroxylation by cytochrome P450, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2998–3005.
- [26] Uetrecht, J. P., Trager, W., Drug metabolism. *Chemical and enzymatic aspects*, Informa Healthcare, New York, **2007**.
- [27] Karuzina, I. I., Archakov, A. I. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions, *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *17*, 557–567.
- [28] Karuzina, I. I., Archakov, A. I. The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions, *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16*, 73–97.
- [29] Eiben, S., Kaysser, L., Maurer, S., Kuhnel, K., Urlacher, V. B., Schmid, R. D. Preparative use of isolated CYP102 monooxygenases -- a critical appraisal, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 662–669.

-
- [30] Gricman, Ł., Vogel, C., Pleiss, J. Conservation analysis of class-specific positions in cytochrome P450 monooxygenases: functional and structural relevance, *Proteins* **2014**, *82*, 491–504.
- [31] Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S. S., Peterson, J. A., Deisenhofer, J. Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures, *Structure*, *3*, 41–62.
- [32] Thomas L. Poulos and Eric F. Johnson, Structures of Cytochrome P450 Enzymes in *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg.: Ortiz de Montellano, Paul R.), Springer International Publishing, Cham, **2015**, 3–32.
- [33] Mestres, J. Structure conservation in cytochromes P450, *Proteins* **2005**, *58*, 596–609.
- [34] Gotoh, O. Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 83–90.
- [35] Peterson, J. A., Graham, S. E. A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450, *Structure*, *6*, 1079–1085.
- [36] Herzog, K., Bracco, P., Onoda, A., Hayashi, T., Hoffmann, K., Schallmeyer, A. Enzyme-substrate complex structures of CYP154C5 shed light on its mode of highly selective steroid hydroxylation, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70*, 2875–2889.
- [37] Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts, *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 128–145.
- [38] Urlacher, V. B., Eiben, S. Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 324–330.
- [39] Bernhardt, R., Urlacher, V. B. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6185–6203.
- [40] Wenda, S., Illner, S., Mell, A., Kragl, U. Industrial biotechnology—the future of green chemistry?, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007.
- [41] Venkatakrishnan, K., Moltke, L. L. von, Greenblatt, D. J. Human drug metabolism and the cytochromes P450, *J. Clin. Pharmacol.* **2001**, *41*, 1149–1179.
- [42] Martinez, C., Rupasinghe, S. Cytochrome P450 bioreactors in the pharmaceutical industry, *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1470–1490.
- [43] Zollner, A., Buchheit, D., Meyer, M. R., Maurer, H. H., Peters, F. T., Bureik, M. Production of human phase 1 and 2 metabolites by whole-cell biotransformation with recombinant microbes, *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1277–1290.

- [44] Cusack, K. P., Koolman, H. F., Lange, U. E. W., Peltier, H. M., Piel, I., Vasudevan, A. Emerging technologies for metabolite generation and structural diversification, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 5471–5483.
- [45] Otey, C. R., Bandara, G., Lalonde, J., Takahashi, K., Arnold, F. H. Preparation of human metabolites of propranolol using laboratory-evolved bacterial cytochromes P450, *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, 93, 494–499.
- [46] Venkataraman, H., Verkade-Vreeker, M. C. A., Capoferri, L., Geerke, D. P., Vermeulen, N. P. E., Commandeur, J. N. M. Application of engineered cytochrome P450 mutants as biocatalysts for the synthesis of benzylic and aromatic metabolites of fenamic acid NSAIDs, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 5613–5620.
- [47] K. Petzoldt, K. Annen, H. Laurent, R. Wiechert, Process for the preparation of 11 β -hydroxy steroids, US4353985 A, **1982**.
- [48] Suzuki, K., Sanga, K.-i., Chikaoka, Y., Itagaki, E. Purification and properties of cytochrome P-450 (P-450_{lun}) catalyzing steroid 11 β -hydroxylation in *Curvularia lunata*, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1203, 215–223.
- [49] Hogg, J. A. Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation, *Steroids* **1992**, 57, 593–616.
- [50] Peterson, D. H., Murray, H. C. MICROBIOLOGICAL OXYGENATION OF STEROIDS AT CARBON 11, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1871–1872.
- [51] Matsuoka, T., Miyakoshi, S., Cytochrome P-450 enzymes;, US5179013, **1993**.
- [52] Serizawa, N., Matsuoka, T. A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, *Biochim. Biophys. Acta.* **1991**, 1084, 35–40.
- [53] Watanabe, I., Nara, F., Serizawa, N. Cloning, characterization and expression of the gene encoding cytochrome P-450_{sca-2} from *Streptomyces carbophilus* involved in production of pravastatin, a specific HMG-CoA reductase inhibitor, *Gene* **1995**, 163, 81–85.
- [54] Paddon, C. J., Westfall, P. J., Pitera, D. J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., Leavell, M. D., Tai, A., Main, A., Eng, D. *et al.* High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin, *Nature* **2013**, 496, 528–532.
- [55] Peplow, M. Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance, *Nature* **2016**, 530, 389–390.
- [56] Peplow, M. Malaria drug made in yeast causes market ferment, *Nature* **2013**, 494, 160–161.

- [57] Hanson, A. D., Pribat, A., Waller, J. C., Crecy-Lagard, V. de 'Unknown' proteins and 'orphan' enzymes: the missing half of the engineering parts list--and how to find it, *Biochem. J.* **2010**, 425, 1–11.
- [58] Guengerich, F. P., Tang, Z., Salamanca-Pinzon, S. G., Cheng, Q. Characterizing proteins of unknown function: orphan cytochrome p450 enzymes as a paradigm, *Mol. Interv.* **2010**, 10, 153–163.
- [59] Guengerich, F. P., Tang, Z., Cheng, Q., Salamanca-Pinzon, S. G. Approaches to deorphanization of human and microbial cytochrome P450 enzymes, *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, 1814, 139–145.
- [60] Guengerich, F. P., Cheng, Q. Orphans in the human cytochrome P450 superfamily: approaches to discovering functions and relevance in pharmacology, *Pharmacol. Rev.* **2011**, 63, 684–699.
- [61] Stark, K., Guengerich, F. P. Characterization of orphan human cytochromes P450, *Drug Metab. Rev.* **2007**, 39, 627–637.
- [62] Overbeek, R., Fonstein, M., D'Souza, M., Pusch, G. D., Maltsev, N. The use of gene clusters to infer functional coupling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 2896–2901.
- [63] Lamb, D. C., Guengerich, F. P., Kelly, S. L., Waterman, M. R. Exploiting *Streptomyces coelicolor* A3(2) P450s as a model for application in drug discovery, *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, 2, 27–40.
- [64] Denison, M. S., Whitlock, J. P. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 18175–18178.
- [65] Torres, S., Fjetland, C. R., Lammers, P. J. Alkane-induced expression, substrate binding profile, and immunolocalization of a cytochrome P450 encoded on the nifD excision element of *Anabaena 7120*, *BMC Microbiol.* **2005**, 5, 16.
- [66] Cheng, Q., Guengerich, F. P. Identification of endogenous substrates of orphan cytochrome P450 enzymes through the use of untargeted metabolomics approaches, *Methods Mol. Biol.* **2013**, 987, 71–77.
- [67] Cheng, Q., Lamb, D. C., Kelly, S. L., Lei, L., Guengerich, F. P. Cyclization of a cellular dipentaenone by *Streptomyces coelicolor* cytochrome P450 154A1 without oxidation/reduction, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 15173–15175.
- [68] Luthra, A., Denisov, I. G., Sligar, S. G. Spectroscopic features of cytochrome P450 reaction intermediates, *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, 507, 26–35.
- [69] Bleif, S., Hannemann, F., Lisurek, M., Kries, J. P. von, Zapp, J., Dietzen, M., Antes, I., Bernhardt, R. Identification of CYP106A2 as a regioselective allylic bacterial diterpene hydroxylase, *Chembiochem* **2011**, 12, 576–582.

- [70] Sielaff, B., Andreessen, J. R. Kinetic and binding studies with purified recombinant proteins ferredoxin reductase, ferredoxin and cytochrome P450 comprising the morpholine mono-oxygenase from *Mycobacterium sp.* strain HE5, *FEBS J.* **2005**, 272, 1148–1159.
- [71] Simgen, B., Contzen, J., Schwarzer, R., Bernhardt, R., Jung, C. Substrate binding to 15beta-hydroxylase (CYP106A2) probed by FT infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch vibration, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 269, 737–742.
- [72] Girhard, M., Klaus, T., Khatri, Y., Bernhardt, R., Urlacher, V. B. Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 87, 595–607.
- [73] Buhler, C. von, Le-Huu, P., Urlacher, V. B. Cluster screening: an effective approach for probing the substrate space of uncharacterized cytochrome P450s, *Chembiochem* **2013**, 14, 2189–2198.
- [74] Podust, L. M., Bach, H., Kim, Y., Lamb, D. C., Arase, M., Sherman, D. H., Kelly, S. L., Waterman Comparison of the 1.85 Å structure of CYP154A1 from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with the closely related CYP154C1 and CYPs from antibiotic biosynthetic pathways, *Protein Sci.* **2004**, 13, 255–268.
- [75] Podust, L. M., Kim, Y., Arase, M., Neely, B. A., Beck, B. J., Bach, H., Sherman, D. H., Lamb, D. C., Kelly, S. L., Waterman The 1.92-Å structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) CYP154C1. A new monooxygenase that functionalizes macrolide ring systems, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 12214–12221.
- [76] Agematu, H., Matsumoto, N., Fujii, Y., Kabumoto, H., Doi, S., Machida, K., Ishikawa, J., Arisawa, A. Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes P450 using the *Escherichia coli* expression system, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, 70, 307–311.
- [77] Choi, K.-Y., Park, H.-Y., Kim, B.-G. Characterization of bi-functional CYP154 from *Nocardia farcinica* IFM10152 in the O-dealkylation and ortho-hydroxylation of formononetin, *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, 47, 327–334.
- [78] Jung, E., Choi, K.-Y., Jung, D.-h., Yun, H., Kim, B.-G. Ortho-hydroxylation of mammalian lignan enterodiol by cytochrome P450s from *Actinomycetes sp.*, *Korean J. Chem. Eng.* **2015**, 32, 471–477.
- [79] Bracco, P., Janssen, D. B., Schallmeyer, A. Selective steroid oxyfunctionalisation by CYP154C5, a bacterial cytochrome P450, *Microb. Cell Fact.* **2013**, 12, 95.
- [80] Girhard, M., Tieves, F., Weber, E., Smit, M. S., Urlacher, V. B. Cytochrome P450 reductase from *Candida apicola*: versatile redox partner for bacterial P450s, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 1625–1635.

- [81] Bogazkaya, A. M., Bühler, C. J. von, Kriening, S., Busch, A., Seifert, A., Pleiss, J., Laschat, S., Urlacher, V. B. Selective allylic hydroxylation of acyclic terpenoids by CYP154E1 from *Thermobifida fusca* YX, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1347–1353.
- [82] Schallmeyer, A., den Besten, G., Teune, I. G. P., Kembaren, R. F., Janssen, D. B. Characterization of cytochrome P450 monooxygenase CYP154H1 from the thermophilic soil bacterium *Thermobifida fusca*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1475–1485.
- [83] Makino, T., Katsuyama, Y., Otomatsu, T., Misawa, N., Ohnishi, Y. Regio- and stereospecific hydroxylation of various steroids at the 16 α position of the D ring by the *Streptomyces griseus* cytochrome P450 CYP154C3, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 1371–1379.
- [84] Kirsty J. McLean, David Leys and Andrew W. Munro, Microbial Cytochrome P450 in *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg.: Ortiz de Montellano, Paul R.), Springer International Publishing, Cham, **2015**, 261–408.
- [85] Bühler, C. J. von, Urlacher, V. B. A novel P450-based biocatalyst for the selective production of chiral 2-alkanols, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4089.
- [86] Kai Xiao, Hong-Jun Zhang, Li-Jiang Xuan, Juan Zhang, Ya-Ming Xu, Dong-Lu Bai Stilbenoids: Chemistry and bioactivities, *Studies in Natural Products Chemistry* **2008**, 453–646.
- [87] Langcake, P., Pryce, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury, *Physiol. Plant Pathol.* **1976**, *9*, 77–86.
- [88] Sobolev, V. S. Production of phytoalexins in peanut (*Arachis hypogaea*) seed elicited by selected microorganisms, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1850–1858.
- [89] Riviere, C., Pawlus, A. D., Merillon, J.-M. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1317–1333.
- [90] Daniel B. Niesen, Craig Hessler and Navindra P. Seeram* Beyond resveratrol: A review of natural stilbenoids identified from 2009–2013, *J. Berry Res.*, *2013*, 181–196.
- [91] Gorham, J. Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and *Hydrangea*, *Phytochemistry* **1977**, *16*, 249–253.
- [92] Langcake, P., Pryce, R. J. A new class of phytoalexins from grapevines, *Experientia* **1977**, *33*, 151–152.
- [93] Xie, L., Bolling, B. W. Characterisation of stilbenes in California almonds (*Prunus dulcis*) by UHPLC-MS, *Food Chem.* **2014**, *148*, 300–306.
- [94] Hovelstad, H., Leirset, I., Oyaas, K., Fiksdahl, A. Screening analyses of pinosylvin stilbenes, resin acids and lignans in norwegian conifers, *Molecules* **2006**, *11*, 103–114.

- [95] Lindberg, M., Lundgren, L., Gref, R., Johansson, M. Stilbenes and resin acids in relation to the penetration of *Heterobasidion annosum* through the bark of *Picea abies*, *Forest Pathol.* **1992**, 22, 95–106.
- [96] Aguamah, G. E., Langcake, P., Leworthy, D. P., Page, J. A., Pryce, R. J., Strange, R. N. Two novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogaea*, *Phytochemistry* **1981**, 20, 1381–1383.
- [97] W H Richardson, T M Schmidt, and K H Neilson Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, 1602–1605.
- [98] Joyce, S. A., Brachmann, A. O., Glazer, I., Lango, L., Schwar, G., Clarke, D. J., Bode, H. B. Bacterial biosynthesis of a multipotent stilbene, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 1942–1945.
- [99] Lin, L., Ni, B., Lin, H., Zhang, M., Li, X., Yin, X., Qu, C., Ni, J. Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.: a review, *J. Ethnopharmacol.* **2015**, 159, 158–183.
- [100] Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes, *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, 834, 275–278.
- [101] Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M. E. J., Crozier, A. Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3337–3340.
- [102] Kopp, P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'?, *Eur. J. Endocrinol.* **1998**, 138, 619–620.
- [103] Pangeni, R., Sahni, J. K., Ali, J., Sharma, S., Baboota, S. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery, *Expert. Opin. Drug. Deliv.* **2014**, 11, 1285–1298.
- [104] Austin, M. B., Bowman, M. E., Ferrer, J.-L., Schroder, J., Noel, J. P. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1179–1194.
- [105] Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., Clement, C., Courot, E. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants, *BioFactors (Oxford, England)* **2010**, 36, 331–341.
- [106] Gehlert, R. Stilbene synthase from seedlings of *Pinus sylvestris*, *Mol. Plant Microbe Interact.* **1990**, 3, 444.
- [107] M. Morales, J. Alcántara, A. Ros Barceló Oxidation of *trans*-resveratrol by a hypodermal peroxidase isoenzyme from gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries, *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, 33–38.

- [108] Teguo, P. W., Decendit, A., Vercauteren, J., Deffieux, G., Mérillon, J.-M. *Trans*-resveratrol-3-O- β -glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *vitis vinifera*, *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1591–1593.
- [109] Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D., Hugueney, P. A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine, *Plant Physiol.* **2008**, *148*, 1630–1639.
- [110] Yang, T., Fang, L., Rimando, A. M., Sobolev, V., Mockaitis, K., Medina-Bolivar, F. Characterization of stilbenoid-specific prenyltransferase activity in peanut hairy roots, *Plant Physiol.* **2016**.
- [111] Ferré-Filmon, K., Delaude, L., Demonceau, A., Noels, A. F. Catalytic methods for the synthesis of stilbenes with an emphasis on their phytoalexins, *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 2323–2336.
- [112] Guiso, M., Marra, C., Farina, A. A new efficient resveratrol synthesis, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 597–598.
- [113] Likhtenshtein, G. I., Stilbenes. *Applications in chemistry, life sciences and materials science*, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.
- [114] Velu, S. S. Strategies and methods for the syntheses of natural oligomeric stilbenoids and analogues, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 605–662.
- [115] Ali, M. A., Kondo, K., Tsuda, Y. Synthesis and nematocidal activity of hydroxystilbenes, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1130–1136.
- [116] Cheng, J.-C., Fang, J.-G., Chen, W.-F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.-L. Structure-activity relationship studies of resveratrol and its analogues by the reaction kinetics of low density lipoprotein peroxidation, *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 142–157.
- [117] Thakkar, K., Geahlen, R. L., Cushman, M. Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of polyhydroxylated stilbene analogs of piceatannol, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2950–2955.
- [118] Bachelor, F. W., Loman, A. A., Snowdon, L. R. Synthesis of pinosylvin and related heartwood stilbenes, *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 1554–1557.
- [119] Andrus, M. B., Liu, J., Meredith, E. L., Nartey, E. Synthesis of resveratrol using a direct decarbonylative Heck approach from resorcylic acid, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4819–4822.
- [120] Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C., Courot, E. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 706–713.

- [121] Mei, Y.-Z., Liu, R.-X., Wang, D.-P., Wang, X., Dai, C.-C. Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms, *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 9–18.
- [122] Lu, Y., Shao, D., Shi, J., Huang, Q., Yang, H., Jin, M. Strategies for enhancing resveratrol production and the expression of pathway enzymes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**.
- [123] Venugopalan, A., Srivastava, S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 873–887.
- [124] Smetanska, I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2008**, *111*, 187–228.
- [125] Lim, C. G., Fowler, Z. L., Hueller, T., Schaffer, S., Koffas, M. A. G. High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3451–3460.
- [126] Li, M., Kildegaard, K. R., Chen, Y., Rodriguez, A., Borodina, I., Nielsen, J. *De novo* production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*, *Metab. Eng.* **2015**, *32*, 1–11.
- [127] van Summeren-Wesenhagen, P. V., Marienhagen, J. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the synthesis of the plant polyphenol pinosylvin, *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 840–849.
- [128] Kallscheuer, N., Vogt, M., Stenzel, A., Gatgens, J., Bott, M., Marienhagen, J. Construction of a *Corynebacterium glutamicum* platform strain for the production of stilbenes and (2S)-flavanones, *Metab. Eng.* **2016**, *38*, 47–55.
- [129] Lin, Y., Yan, Y. Biotechnological production of plant-specific hydroxylated phenylpropanoids, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 1895–1899.
- [130] Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A. *et al.* Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2477–2486.
- [131] Wells, A. V., Li, P., Champion, P. M., Martinis, S. A., Sligar, S. G. Resonance Raman investigations of *Escherichia coli*-expressed *Pseudomonas putida* cytochrome P450 and P420, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4384–4393.
- [132] Martinis, S. A., Blanke, S. R., Hager, L. P., Sligar, S. G., Hoa, G. H., Rux, J. J., Dawson, J. H. Probing the heme iron coordination structure of pressure-induced cytochrome P420cam, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14530–14536.
- [133] Philipp Krüger, *Bachelorarbeit*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- [134] Clemens-Jeremias von Bühler, *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, **2014**.

- [135] Momoi, K., Hofmann, U., Schmid, R. D., Urlacher, V. B. Reconstitution of beta-carotene hydroxylase activity of thermostable CYP175A1 monooxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 339, 331–336.
- [136] Derewenda, Z. S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization, *Methods (San Diego, Calif.)* **2004**, 34, 354–363.
- [137] Waugh, D. S. Making the most of affinity tags, *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, 316–320.
- [138] Leys, D., Mowat, C. G., McLean, K. J., Richmond, A., Chapman, S. K., Walkinshaw, M. D., Munro, A. W. Atomic structure of Mycobacterium tuberculosis CYP121 to 1.06 Å reveals novel features of cytochrome P450, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 5141–5147.
- [139] Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics (Oxford, England)* **2006**, 22, 195–201.
- [140] Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L. *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, *Nucleic. Acids Res.* **2014**, 42, W252–8.
- [141] Guex, N., Peitsch, M. C., Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective, *Electrophoresis* **2009**, 30 Suppl 1, S162–73.
- [142] Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources, *Nucleic. Acids Res.* **2009**, 37, D387–92.
- [143] Koley, J. N., O'Dwyer, K. M., Jordan, C. T., Fasan, R. Discovery of potent parthenolide-based antileukemic agents enabled by late-stage P450-mediated C—H functionalization, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 164–173.
- [144] Szejtli, J., Atwood, J. L., Lehn, J.-M., Comprehensive supramolecular chemistry. Volume 3 Cyclodextrins, Pergamon, New York, **1996**.
- [145] Szejtli, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes, *J. Mater. Chem.* **1997**, 7, 575–587.
- [146] Lopez-Nicolas, J. M., Bru, R., Sanchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F. Use of 'soluble lipids' for biochemical processes: linoleic acid-cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solutions, *Biochem. J.* **1995**, 308 (Pt 1), 151–154.
- [147] Loftsson, T., Brewster, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85, 1017–1025.
- [148] Morales, M., Bru, R., García-Carmona, F., Ros Barceló, A., Pedreño, M. A. Effect of dimethyl-β-cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before

- and after inoculation with shape *Xylophilus ampelinus*, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **1998**, 53, 179–187.
- [149] Yang, T., Fang, L., Nopo-Olazabal, C., Condori, J., Nopo-Olazabal, L., Balmaceda, C., Medina-Bolivar, F. Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with methyl jasmonate and cyclodextrin, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 3942–3950.
- [150] BAR, R. Cyclodextrin-aided bioconversions and fermentations, *Trends Biotechnol.* **1989**, 7, 2–4.
- [151] Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U. Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnol. Adv.* **2002**, 20, 341–359.
- [152] Weiser, M., Hermann, S., Penner, A., Wagenknecht, H.-A. Photocatalytic nucleophilic addition of alcohols to styrenes in Markovnikov and anti-Markovnikov orientation, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, 11, 568–575.
- [153] Perera, R., Sono, M., Sigman, J. A., Pfister, T. D., Lu, Y., Dawson, J. H. Neutral thiol as a proximal ligand to ferrous heme iron: implications for heme proteins that lose cysteine thiolate ligation on reduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 3641–3646.
- [154] Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2253–2277.
- [155] Hoepfner, A., Schmitt, L., H.J., S.
- [156] Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., McPherson, A. Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, 50, 414–423.
- [157] Trakhanov, S., Quiocho, F. A. Influence of divalent cations in protein crystallization, *Protein Sci.* **1995**, 4, 1914–1919.
- [158] Sousa, R. Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1995**, 51, 271–277.
- [159] Li, H., Poulos, T. L. Conformational dynamics in cytochrome P450-substrate interactions, *Biochimie* **1996**, 78, 695–699.
- [160] Li, H., Poulos, T. L. The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 140–146.
- [161] Pylypenko, O., Schlichting, I. Structural aspects of ligand binding to and electron transfer in bacterial and fungal P450s, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 991–1018.
- [162] Wade, R. C., Winn, P. J., Schlichting, I., Sudarko A survey of active site access channels in cytochromes P450, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1175–1182.

- [163] Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., Schlichting, I. Structure and chemistry of cytochrome P450, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253–2277.
- [164] Isin, E. M., Guengerich, F. P. Substrate binding to cytochromes P450, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 1019–1030.
- [165] C Chothia and A M Lesk The relation between the divergence of sequence and structure in proteins., *EMBO J.* **1986**, *5*, 823–826.
- [166] Keller, R. M., Wuthrich, K. Structural study of the heme crevice in cytochrome b₅ based on individual assignments of the ¹H-NMR lines of the heme group and selected amino acid residues, *Biochim. Biophys. Acta.* **1980**, *621*, 204–217.
- [167] McLachlan, S. J., La Mar, G. N., Burns, P. D., Smith, K. M., Langry, K. C. ¹H-NMR assignments and the dynamics of interconversion of the isomeric forms of cytochrome b₅ in solution, *Biochim. Biophys. Acta.* **1986**, *874*, 274–284.
- [168] Banci, L., Bertini, I., Rosato, A., Scacchieri, S. Solution structure of oxidized microsomal rabbit cytochrome b₅. Factors determining the heterogeneous binding of the heme, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 755–766.
- [169] Walker, F. A., Emrick, D., Rivera, J. E., Hanquet, B. J., Buttlare, D. H. Effect of heme orientation on the reduction potential of cytochrome b₅, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6234–6240.
- [170] Bachmann, S. L., McCarthy, A. J. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*, *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 2121–2130.
- [171] Wilson, D. B. Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes, *Chem. Rec.* **2004**, *4*, 72–82.
- [172] Rahmanpour, R., Rea, D., Jamshidi, S., Fülöp, V., Bugg, T. D. Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds, *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *594*, 54–60.
- [173] Chen, C.-Y., Hsieh, Z.-S., Cheepudom, J., Yang, C.-H., Meng, M. A 24.7-kDa copper-containing oxidase, secreted by *Thermobifida fusca*, significantly increasing the xylanase/cellulase-catalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 8977–8986.
- [174] Xu, F., Bell, S. G., Lednik, J., Insley, A., Rao, Z., Wong, L.-L. The heme monooxygenase cytochrome P450cam can be engineered to oxidize ethane to ethanol, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 4029–4032.
- [175] Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A. M., Maves, S. A., Benson, D. E., Sweet, R. M., Ringe, D., Petsko, G. A., Sligar, S. G. The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution, *Science* **2000**, *287*, 1615–1622.

- [176] Haines, D. C., Tomchick, D. R., Machius, M., Peterson, J. A. Pivotal role of water in the mechanism of P450BM-3 †, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13456–13465.
- [177] Makris, T. M., Koenig, K. von, Schlichting, I., Sligar, S. G. Alteration of P450 distal pocket solvent leads to impaired proton delivery and changes in heme geometry, *Biochemistry* **2007**, *46*, 14129–14140.
- [178] McLean, K. J., Carroll, P., Lewis, D. G., Dunford, A. J., Seward, H. E., Neeli, R., Cheesman, M. R., Marsollier, L., Douglas, P., Smith, W. E. *et al.* Characterization of active site structure in CYP121. A cytochrome P450 essential for viability of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33406–33416.
- [179] Drew, K. L. M., Reynisson, J. The impact of carbon-hydrogen bond dissociation energies on the prediction of the cytochrome P450 mediated major metabolic site of drug-like compounds, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *56*, 48–55.
- [180] Branco, R. J. F., Seifert, A., Budde, M., Urlacher, V. B., Ramos, M. J., Pleiss, J. Anchoring effects in a wide binding pocket: the molecular basis of regioselectivity in engineered cytochrome P450 monooxygenase from *B. megaterium*, *Proteins* **2008**, *73*, 597–607.
- [181] Battersby, A. R., Brown, S. H., Payne, T. G. Biosynthesis of loganin and the indole alkaloids from hydroxygeraniol–hydroxyneryl, *J. Chem. Soc. D* **1970**, *0*, 827–828.
- [182] Meehan, T. D., Coscia, C. J. Hydroxylation of geraniol and nerol by a monooxygenase from *Vinca rosea*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *53*, 1043–1048.
- [183] Collu, G., Unver, N., Peltenburg-Looman, A. M., van der Heijden, R., Verpoorte, R., Memelink, J. Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis, *FEBS Lett.* **2001**, *508*, 215–220.
- [184] Brown, S., Clastre, M., Courdavault, V., O'Connor, S. E. *De novo* production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112*, 3205–3210.
- [185] Cui, L., Ni, X., Ji, Q., Teng, X., Yang, Y., Wu, C., Zekria, D., Zhang, D., Kai, G. Co-overexpression of geraniol-10-hydroxylase and strictosidine synthase improves anti-cancer drug camptothecin accumulation in *Ophiorrhiza pumila*, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8227.
- [186] Sung, P.-H., Huang, F.-C., Do, Y.-Y., Huang, P.-L. Functional expression of geraniol 10-hydroxylase reveals its dual function in the biosynthesis of terpenoid and phenylpropanoid, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4637–4643.
- [187] Kim, D.-H., Ahn, T., Jung, H.-C., Pan, J.-G., Yun, C.-H. Generation of the human metabolite piceatannol from the anticancer-preventive agent resveratrol by bacterial cytochrome P450 BM3, *Drug. Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 932–936.
- [188] Bathelt, C. M., Ridder, L., Mulholland, A. J., Harvey, J. N. Aromatic hydroxylation by cytochrome P450, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15004–15005.

- [189] Maurer, S. C., Kühnel, K., Kaysser, L. A., Eiben, S., Schmid, R. D., Urlacher, V. B. Catalytic Hydroxylation in Biphasic Systems using CYP102A1 Mutants, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1090–1098.
- [190] Kühnel, K., Maurer, S. C., Galejeva, Y., Frey, W., Laschat, S., Urlacher, V. B. Hydroxylation of dodecanoic Acid and (2*R*,4*R*,6*R*,8*R*)-tetramethyldecanol on a preparative scale using an NADH- dependent CYP102A1 mutant, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1451–1461.
- [191] Torres, P., Guillermo Avila, J., Romo de Vivar, A., García, A. M., Marín, J. C., Aranda, E., Céspedes, C. L. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*, *Phytochemistry* **2003**, *64*, 463–473.
- [192] Farines, V., Monje, M.-C., Telo, J. P., Hnawia, E., Sauvain, M., Nepveu, F. Polyphenols as superoxide dismutase modulators and ligands for estrogen receptors, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 103–111.
- [193] Matsuoka, A., Takeshita, K., Furuta, A., Ozaki, M., Fukuhara, K., Miyata, N. The 4'-hydroxy group is responsible for the *in vitro* cytogenetic activity of resveratrol, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2002**, *521*, 29–35.
- [194] Stivala, L. A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U. M., Albini, A., Prosperi, E. *et al.* Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22586–22594.
- [195] Fan, G.-J., Liu, X.-D., Qian, Y.-P., Shang, Y.-J., Li, X.-Z., Dai, F., Fang, J.-G., Jin, X.-L., Zhou, B. 4,4'-Dihydroxy-trans-stilbene, a resveratrol analogue, exhibited enhanced antioxidant activity and cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2360–2365.
- [196] Savio, M., Coppa, T., Bianchi, L., Vannini, V., Maga, G., Forti, L., Cazzalini, O., Lazze, M. C., Perucca, P., Prosperi, E. *et al.* The resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene inhibits cell proliferation with higher efficiency but different mechanism from resveratrol, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 2493–2502.
- [197] Maccario, C., Savio, M., Ferraro, D., Bianchi, L., Pizzala, R., Pretali, L., Forti, L., Stivala, L. A. The resveratrol analog 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene suppresses transformation in normal mouse fibroblasts and inhibits proliferation and invasion of human breast cancer cells, *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 2172–2180.
- [198] Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Baba, K. Antitumor activities of synthetic and natural stilbenes through antiangiogenic action, *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 2083–2096.
- [199] Cheng, J.-C., Fang, J.-G., Chen, W.-F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.-L. Structure-activity relationship studies of resveratrol and its analogues by the reaction kinetics of low density lipoprotein peroxidation, *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 142–157.

- [200] Cai, Y.-J., Fang, J.-G., Ma, L.-P., Yang, L., Liu, Z.-L. Inhibition of free radical-induced peroxidation of rat liver microsomes by resveratrol and its analogues, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1637*, 31–38.
- [201] Coppa, T., Lazze, M. C., Cazzalini, O., Perucca, P., Pizzala, R., Bianchi, L., Stivala, L. A., Forti, L., Maccario, C., Vannini, V. *et al.* Structure-activity relationship of resveratrol and its analogue, 4,4'-dihydroxy-*trans*-stilbene, toward the endothelin axis in human endothelial cells, *J. Med. Food* **2011**, *14*, 1173–1180.
- [202] Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Baba, K. Antitumor and antimetastatic activity of synthetic hydroxystilbenes through inhibition of lymphangiogenesis and M2 macrophage differentiation of tumor-associated macrophages, *Anticancer. Res.* **2016**, *36*, 137–148.
- [203] Martí-Centelles, R., Falomir, E., Murga, J., Carda, M., Marco, J. A. Inhibitory effect of cytotoxic stilbenes related to resveratrol on the expression of the VEGF, hTERT and c-Myc genes, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 488–496.
- [204] Uzura, S., Sekine-Suzuki, E., Nakanishi, I., Sonoda, M., Tanimori, S. A facile and rapid access to resveratrol derivatives and their radioprotective activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3886–3891.
- [205] Sotheeswaran, S., Pasupathy, V. Distribution of resveratrol oligomers in plants, *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1083–1092.
- [206] Takaya, Y., Terashima, K., Ito, J., He, Y.-H., Tateoka, M., Yamaguchi, N., Niwa, M. Biomimic transformation of resveratrol, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10285–10290.
- [207] Ponzoni, C., Beneventi, E., Cramarossa, M. R., Raimondi, S., Trevisi, G., Pagnoni, U. M., Riva, S., Forti, L. Laccase-catalyzed dimerization of hydroxystilbenes, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1497–1506.
- [208] Nagao, T., Mitamura, T., Wang, X. H., Negoro, S., Yomo, T., Urabe, I., Okada, H. Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 5013–5020.
- [209] Edelheit, O., Hanukoglu, A., Hanukoglu, I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies, *BMC Biotechnol.* **2009**, *9*, 61.
- [210] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [211] Jancarik, J., Kim, S. H. Sparse matrix sampling, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 409–411.
- [212] Hearn, M., Langford, S., Tuck, K. L., Harris, S., Boysen, R. I., Perchyonok, V. T., Danylec, B., Schwarz, L., Chowdhury, J., Molecularly imprinted polymers, WO2010085851 A1, **2010**.

- [213] Fisher, T. H., Schultz, T. P. ^1H and ^{13}C NMR study of some (*E*)-3'-and 4'-substituted stilben-4-ols, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 966–968.
- [214] Deak, M., Falk, H. On the chemistry of the resveratrol diastereomers, *Monatsh. Chem.* **2003**, *134*, 883–888.
- [215] Zhang, Y., Shen, M., Cui, S., Hou, T. Synthesis and antiproliferative evaluation of 2-hydroxylated (*E*)-stilbenes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5470–5472.
- [216] Albert, S., Horbach, R., Deising, H. B., Siewert, B., Csuk, R. Synthesis and antimicrobial activity of (*E*)-stilbene derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5155–5166.
- [217] Singh, F., Wirth, T. Hypervalent iodine mediated oxidative cyclization of o-hydroxystilbenes into benzo- and naphthofurans, *Synthesis* **2012**, *44*, 1171–1177.
- [218] Rühlmann, A., Antovic, D., Müller, T. J. J., Urlacher, V. B. Regioselective hydroxylation of stilbenes by engineered cytochrome P450 from *Thermobifida fusca* YX, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 984–994.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

<i>A. annua</i>	<i>Artemisia annua</i>
AdR	Adrenodoxin-Reduktase
Adx	Adrenodoxin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
äq.	äquivalent
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CD	Methyl- β -Cyclodextrin
CoA	Coenzym A
CPR	Cytochrom-P450-Reduktase
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
δ	chemische Verschiebung
(d)dH ₂ O	(doppelt) destilliertes Wasser
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	Elektronenspray-Ionisation
ESI-TOF-MS	Elektronenspray-Ionisation Flugzeitmassenspektroskopie
EtAc	Ethylacetat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FeS	Eisen-Schwefel-Cluster
Fdx	Flavodoxin aus <i>E. coli</i>
FdR	Flavodoxin Reduktase aus <i>E. coli</i>
FMN	Flavinmononukleotid
GC/MS	Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
GDH	Glucose-Dehydrogenase
g/v	Gewicht pro Volumen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IS	interner Standard
IUPAC	<i>international union of pure and applied chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kan	Kanamycin
<i>k_{cat}</i>	katalytische Konstante
kDa	Kilodalton
<i>K_D</i>	Dissoziationskonstante
<i>K_M</i>	Michaelis-Menten-Konstante
<i>lacI</i>	Lactoserepressor codierendes Gen

LB	<i>lysogeny broth</i>
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse/Ladung
NAD(P)H	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	nicht detektierbar
<i>N. farcinica</i>	<i>Nocardia farcinica</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ori	Replikationsursprung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P450	Cytochrom-P450-Monooxygenase
P450-BM3	CYP102A1 aus <i>Bacillus megaterium</i>
P450cam	CYP101A1 aus <i>Pseudomonas putida</i>
P450cin	CYP176A1 aus <i>Citrobacter braakii</i>
P450scc	CYP11A1 aus Wirbeltieren scc = side-chain cleavage
PDB	<i>protein data bank</i>
PdR	Putidaredoxin-Reduktase aus <i>Pseudomonas putida</i>
Pdx	Putidaredoxin aus <i>Pseudomonas putida</i>
PEG	Polyethylenglycol
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
T7-P	T7-Promotor
T7-T	T7-Terminator
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>S. griseus</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
<i>sp.</i>	<i>species</i>
SRS	<i>substrate recognition sites</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TMS	Tetramethylsilan
Tfb	<i>transformation buffer</i>
<i>T. fusca</i>	<i>Thermobifida fusca</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTN	<i>total turnover number</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
V _{max}	maximale Geschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen

Ein- und Dreibuchstabencode von Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

7.2 Substratbibliothek und Formelregister**7.2.1 Substratbibliothek für das Cluster-Screening**

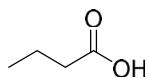
Tabelle 19. Substratbibliothek für das Cluster-Screening. Die Stilbene (*E*)-Stilben (**1a**) (*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**), (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**), Pinosylvlin (**1d**) und (*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**) wurden entsprechend der hierzu gehörenden Veröffentlichung beziffert.^[218]

Nummer	Substrat	Nummer	Substrat
	Fettsäuren		Terpene
1	Butansäure	51	α -Ionon
2	Pentansäure	52	β -Ionon
3	Hexansäure	53	(+)-Nootkaton
4	Heptansäure	54	Geranylacetat
5	Octansäure	55	Nootkatol
6	Decansäure	56	α -Pinien
7	Dodecansäure		
8	Tetradecansäure		Coumarin- und Flavonderivate
9	Hexadecansäure	57	7-Ethoxycoumarin
10	Octadecansäure	58	Umbelliferon
		59	Coumarin
	verzweigte Fettsäuren/Alkohole	60	7-Methoxycoumarin
11	2,4,6-Trimethyloctansäure	61	Dihydrocoumarin
12	2,4,6-Trimethyloctanol	62	α -Naphthoflavin
13	2,4,6-Trimethyloctansäuremethylester	63	Chrysin
14	2,4,6,8-Tetramethyldecansäure	64	Flavon
15	2,4,6,8-Tetramethyldecanol		
			Lignin Bestandteile
	diverse Alkohole	65	<i>p</i> -Cumarsäure
16	1-Butanol	66	Coniferylalkohol
17	2-Butanol	67	Phenyllessigsäure

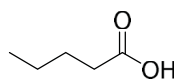
18	2-Pentanol	68	Homovanillinsäure
19	1-Heptanol	69	(<i>E</i>)-Zimtsäure
20	2-Heptanol	70	Methyleugenol
21	1-Octanol	71	Ferulasäuremethylester
22	2-Octanol	72	Benzoessäure
23	3-Octanol	73	Eugenol
24	2-Nonanol	74	Guaiacolglycerylether
25	1-Decanol	75	Ferulasäure
26	1,4-Butandiol	76	Vanillin
27	1-Phenylethanol	77	Vanillinsäure
28	2-Phenylethanol	78	3,4,5-Trimethoxyzimtsäure
		79	Sinapinsäure
	Alkane	80	Guaiacol
29	Heptan		
30	Octan		Zyklische Verbindungen/Aromaten
31	Nonan	81	Naphthalen
32	Decan	82	Oxacyclododecan-2-on
		83	γ -Octalacton
	Thiole/Thioether	84	γ -Nonalacton
33	1-Octanthiol	85	1,8-Dihydroxyanthraquinon
34	Thioanisol	86	Anthraquinon
35	n-Butylmethylthioether	87	(<i>E</i>)-4-Methoxystilben
36	Benzylmethylthioether	88	2-Ethylthiazol
		89	2-Acetylpyridin
	Terpene	90	2-Ethylpyridin
37	Campher	91	Tryptamin
38	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-(-)- Isopinocampheylamin	92	2-Phenylethylacetat
39	Geraniol	93	Testosteron
40	Nerol	94	Cholesterol
41	Farnesol	95	Pergolid
42	Farnesylaceton	96	Dextromethorphan
43	Cembren a	97	Erythromycin
44	(+)-Valencen	98	Grundmanns Keton
45	(1 <i>S</i>)-(-)-Verbenon	1a	(<i>E</i>)-Stilben
46	(<i>S</i>)-Perillaalkohol	1b	(<i>E</i>)-2-Hydroxystilben
47	<i>p</i> -Cymol	1c	(<i>E</i>)-3-Hydroxystilben
48	(+)-(<i>R</i>)-Limonen	1d	Pinosylvin
49	(-)-(<i>S</i>)-Limonen	2a	(<i>E</i>)-4-Hydroxystilben
50	Myrtenol		

7.2.2 Formelregister für das Cluster-Screening

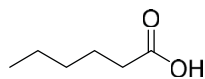
Fettsäuren



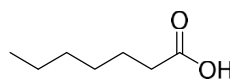
Butansäure (1)



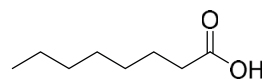
Pentansäure (2)



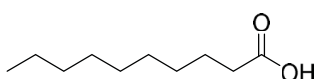
Hexansäure (3)



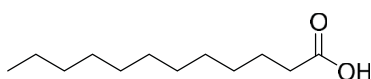
Heptansäure (4)



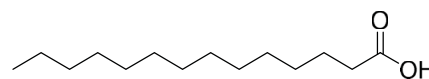
Octansäure (5)



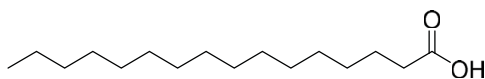
Decansäure (6)



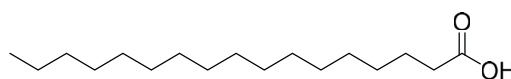
Dodecansäure (7)



Tetradecansäure (8)

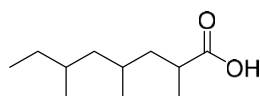


Hexadecansäure (9)

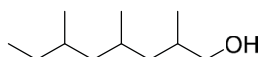


Octadecansäure (10)

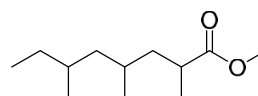
Verzweigte Fettsäuren/Alkohole



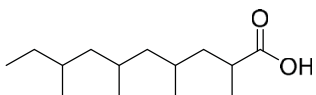
2,4,6-Trimethyloctansäure (11)



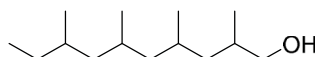
2,4,6-Trimethyloctanol (12)



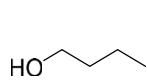
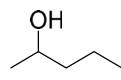
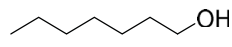
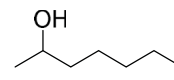
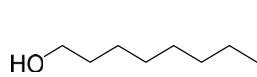
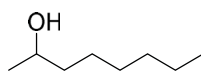
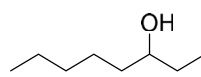
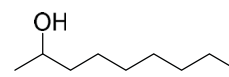
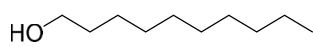
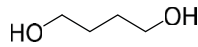
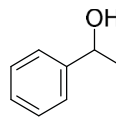
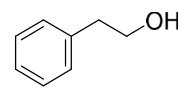
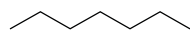
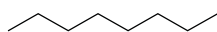
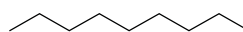
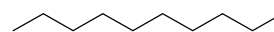
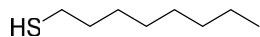
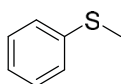
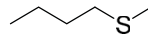
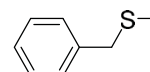
2,4,6-Trimethyloctansäuremethylester (13)



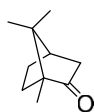
2,4,6,8-Tetramethyldecansäure (14)



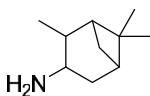
2,4,6,8-Tetramethyldecanol (15)

Diverse Alkohole1-Butanol (**16**)2-Butanol (**17**)2-Pentanol (**18**)1-Heptanol (**19**)2-Heptanol (**20**)1-Octanol (**21**)2-Octanol (**22**)3-Octanol (**23**)2-Nonanol (**24**)1-Decanol (**25**)1,4-Butandiol (**26**)1-Phenylethanol (**27**)2-Phenylethanol (**28**)**Alkane**Heptan (**29**)Octan (**30**)Nonan (**31**)Decan (**32**)**Thiole/Thioether**1-Octanthiol (**33**)Thioanisol (**34**)n-Butylmethylthioether (**35**)Benzylmethylthioether (**36**)

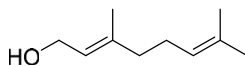
Terpene



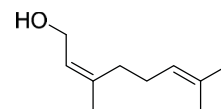
Campher (37)



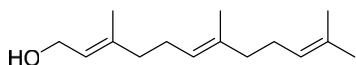
Isopinocampheylamin (38)



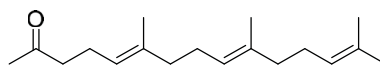
Geraniol (39)



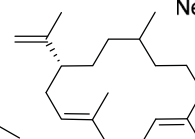
Nerol (40)



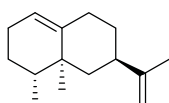
Farnesol (41)



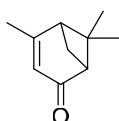
Farnesylacetone (42)



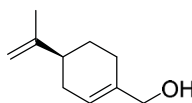
Cembrene a (43)



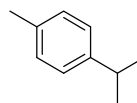
(+) -Valencene (44)



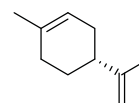
Verbenone (45)



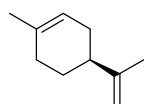
(S) -Perillaalcohol (46)



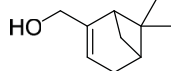
p-Cymol (47)



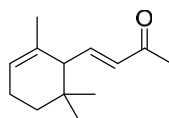
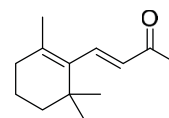
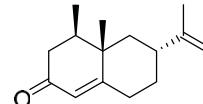
(+) - (R) -Limonene (48)



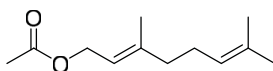
(-) - (S) -Limonene (49)



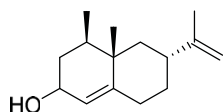
Myrtenol (50)

 α -Ionone (51) β -Ionone (52)

(+) -Nootkatone (53)



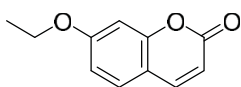
Geranylacetate (54)



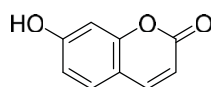
Nootkatol (55)

 α -Pinene (56)

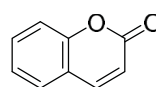
Coumarin- und Flavonderivate



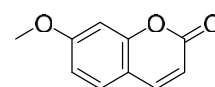
7-Ethoxycoumarin (57)



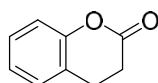
Umbelliferone (58)



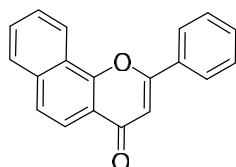
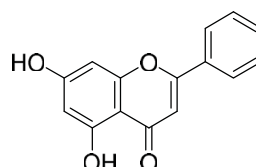
Coumarin (59)



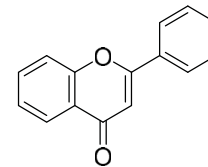
7-Methoxycoumarin (60)



Dihydrocoumarin (61)

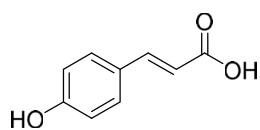
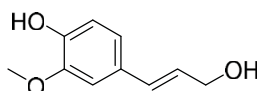
 α -Naphthoflavone (62)

Chrysin (63)

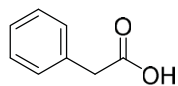


Flavone (64)

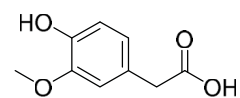
Lignin-Bestandteile

*p*-Cumarsäure (65)

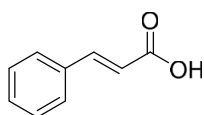
Coniferylalkohol (66)



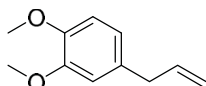
Phenyllessigsäure (67)



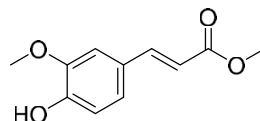
Homovanillinsäure (68)



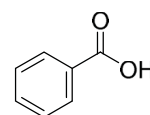
(E)-Zimtsäure (69)



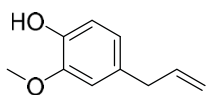
Methyleugenol (70)



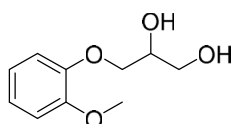
Ferulasäuremethylester (71)



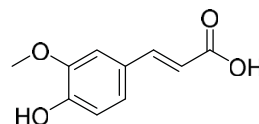
Benzoessäure (72)



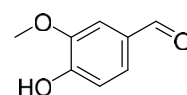
Eugenol (73)



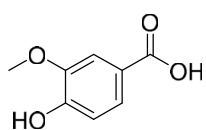
Guaiacolglycerylether (74)



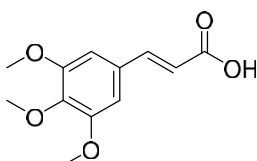
Ferulasäure (75)



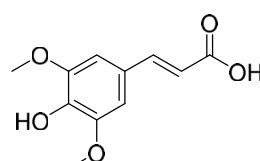
Vanillin (76)



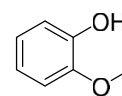
Vanillinsäure (77)



3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (78)

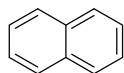


Sinapinsäure (79)

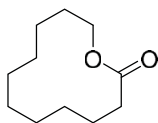


Guaiacol (80)

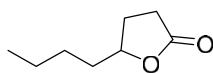
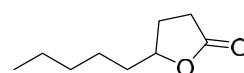
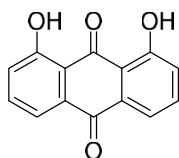
Zyklische Verbindungen/Aromaten



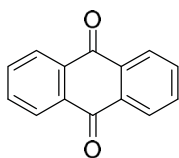
Naphthalen (81)



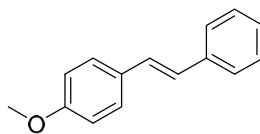
Oxacyclododecan-2-on (82)

 γ -Octalacton (83) γ -Nonalacton (84)

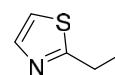
1,8-Dihydroxyanthraquinon (85)



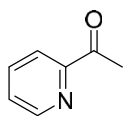
Anthraquinon (86)



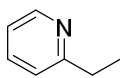
(E)-4-Methoxystilben (87)



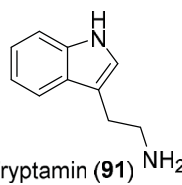
2-Ethylthiazol (88)



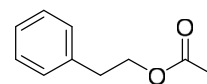
2-Acetylpyridin (89)



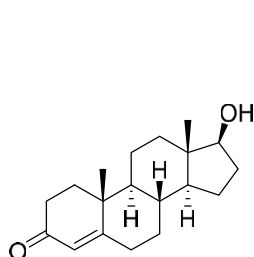
2-Ethylpyridin (90)



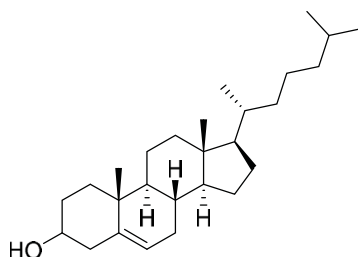
Tryptamin (91)



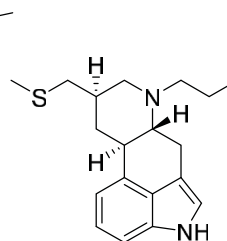
2-Phenylethylacetat (92)



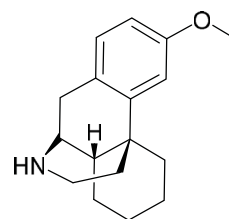
Testosteron (93)



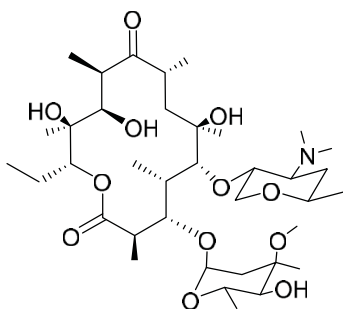
Cholesterol (94)



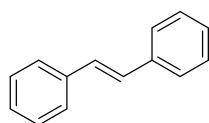
Pergolid (95)



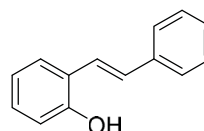
Dextromethorphan (96)



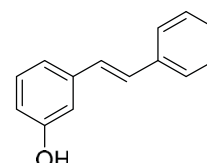
Erythromycin (97)



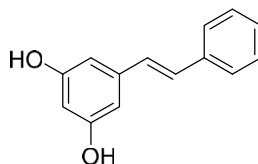
(E)-Stilben (1a)



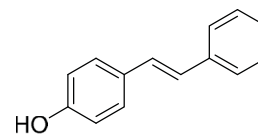
(E)-2-Hydroxystilben (1b)



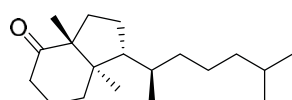
(E)-3-Hydroxystilben (1c)



Pinosylvin (1d)

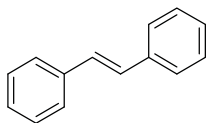


(E)-4-Hydroxystilben (2a)

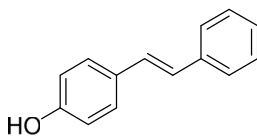


Grundmann's Keton (98)

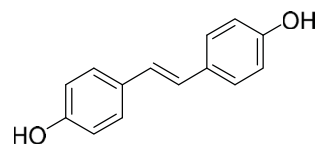
7.2.3 Formelregister der Stilbene



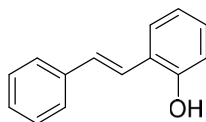
(*E*)-Stilben (**1a**)



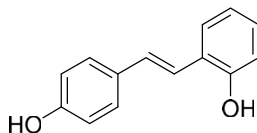
(*E*)-4-Hydroxystilben (**2a**)



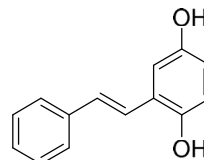
(*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**)



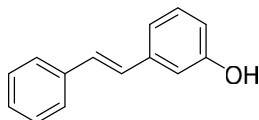
(*E*)-2-Hydroxystilben (**1b**)



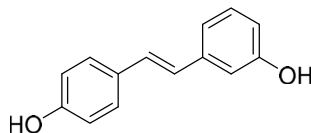
(*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (**2b**)



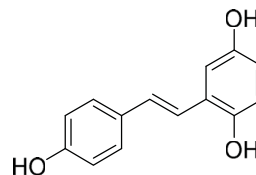
(*E*)-2,5-Dihydroxystilben (**3b**)



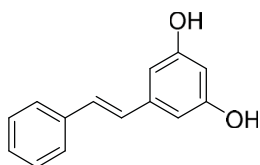
(*E*)-2-Hydroxystilben (**1c**)



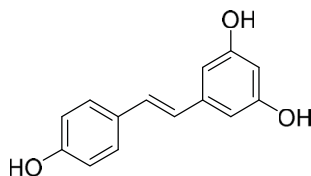
(*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (**2c**)



(*E*)-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**)



Pinosylvin (**1d**)



Resveratrol (**2d**)

7.3 MS-Spektren

7.3.1 MS-Spektren von Geraniol und (*E*)-8-Hydroxygeraniol

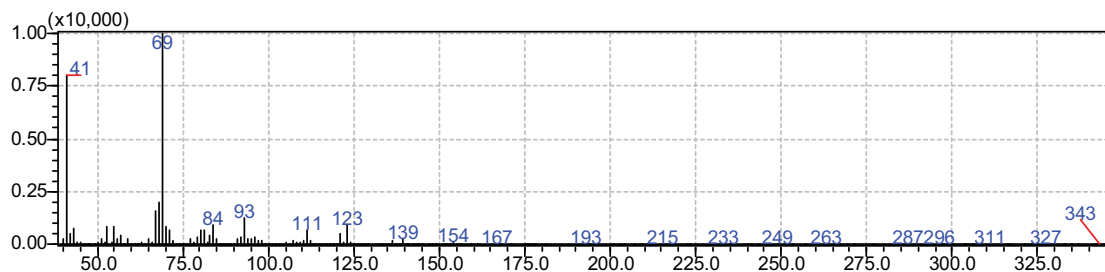


Abbildung 39: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von Geraniol

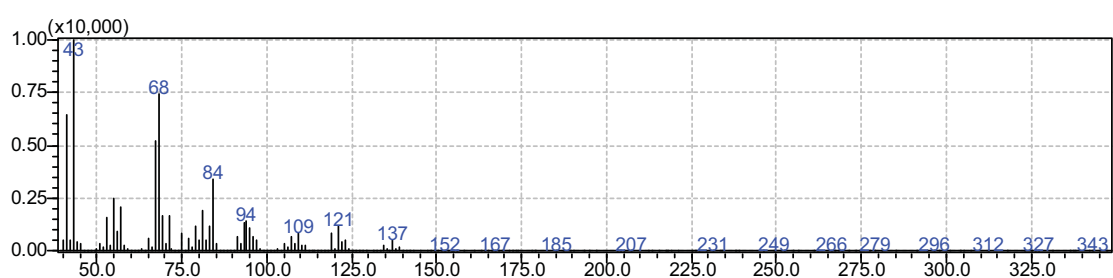


Abbildung 40: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (*E*)-8-Hydroxygeraniol

7.3.2 MS-Spektren der Stilbene

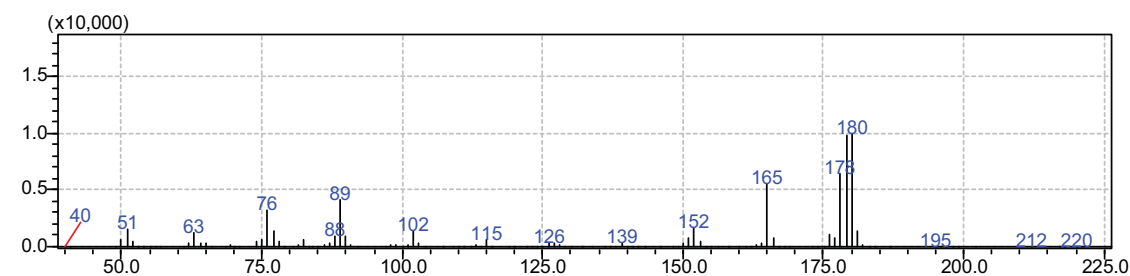


Abbildung 41: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (*E*)-Stilben (1a) [M]⁺ = 180

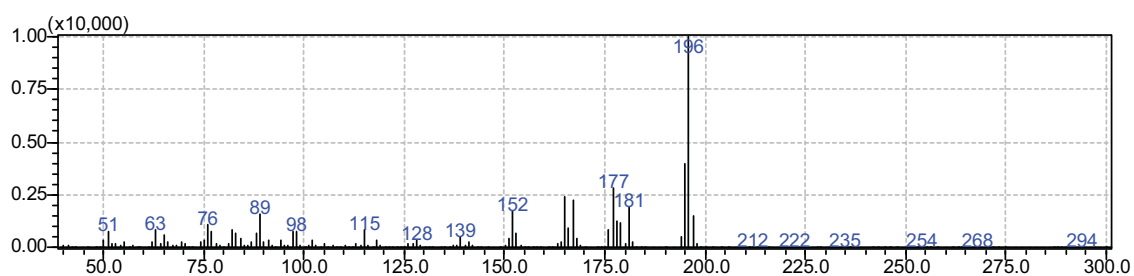
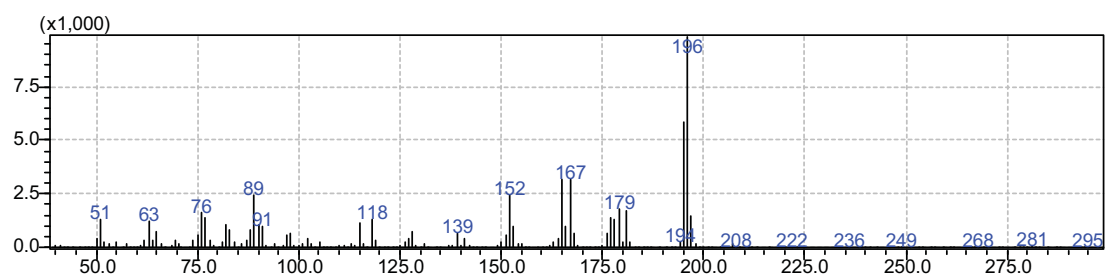
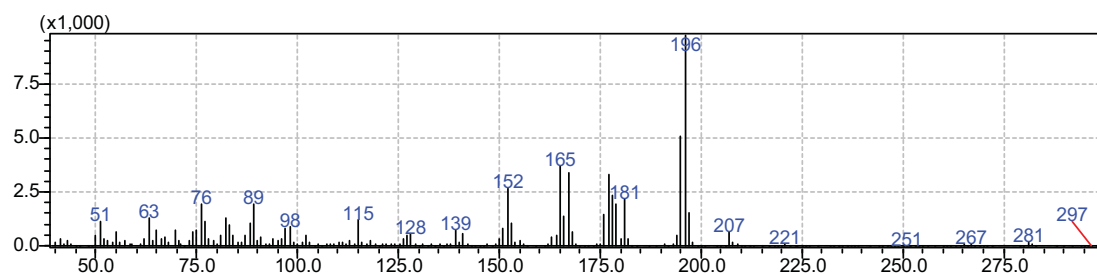
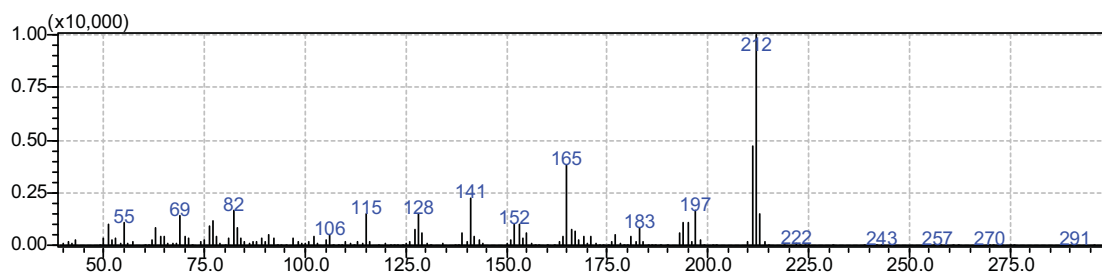
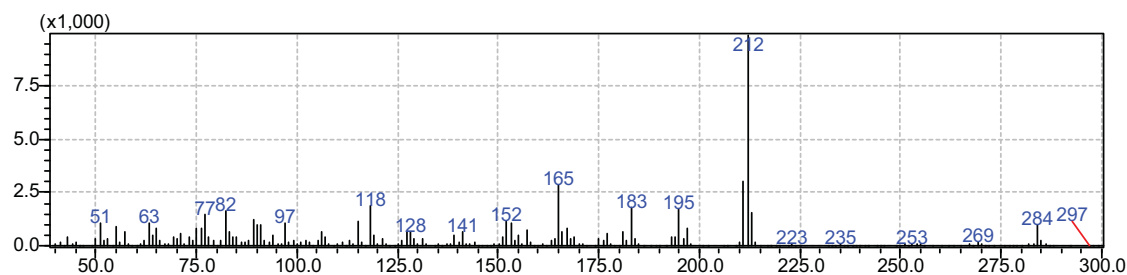
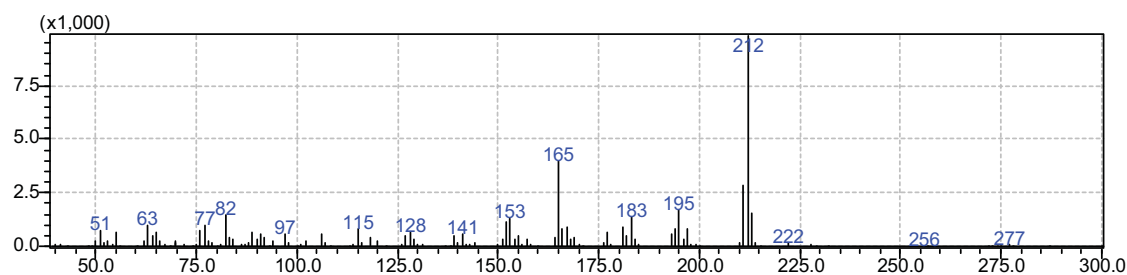
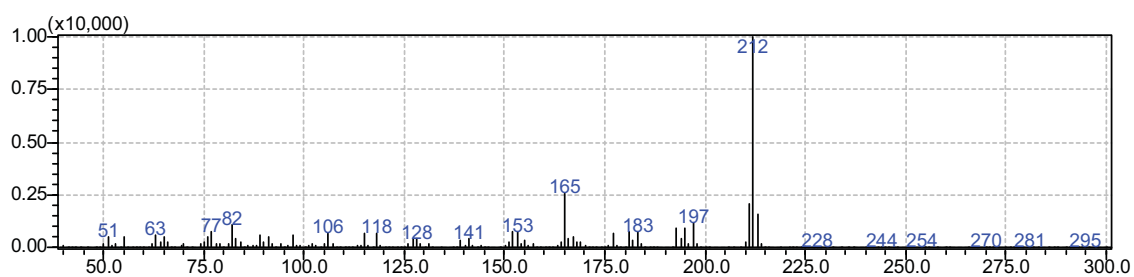
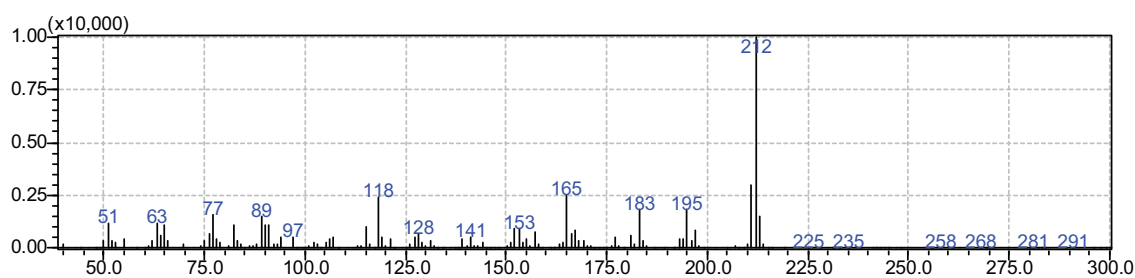
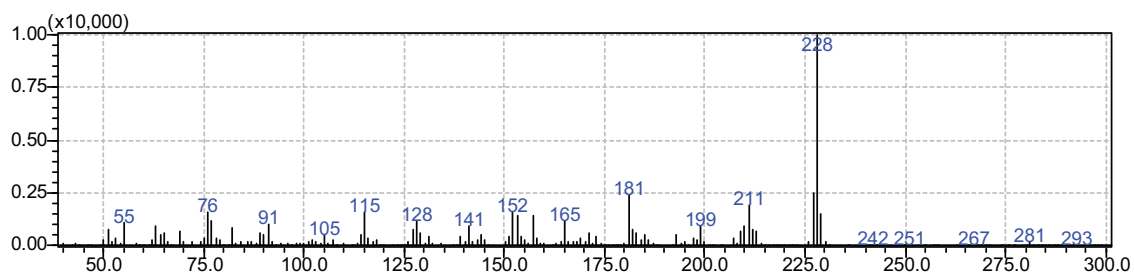
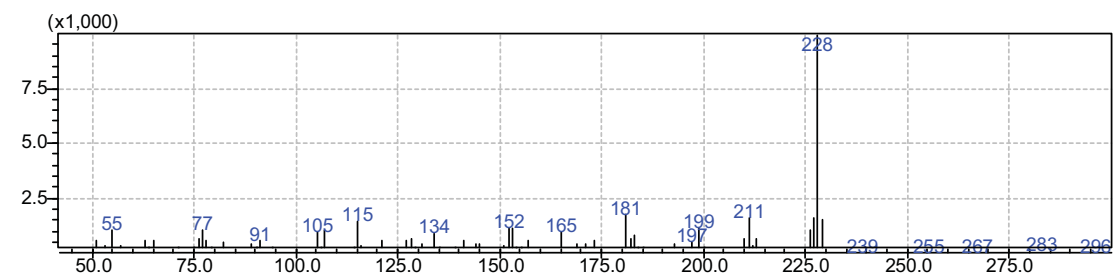


Abbildung 42: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (*E*)-4-Hydroxystilben (2a)

Abbildung 43: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (*E*)-2-Hydroxystilben (1b)Abbildung 44: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (*E*)-3-Hydroxystilben (1c)Abbildung 45: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von Pino sylvin (1d)Abbildung 46: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (2b)Abbildung 47: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (2c)

Abbildung 48: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (E)-4,4'-Dihydroxystilben (4a)Abbildung 49: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (E)-2,5-Dihydroxystilben (3b)Abbildung 50: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von Resveratrol (2d)Abbildung 51: MS-Spektrum (EI⁺, 70 eV) von (E)-2,4',5-Trihydroxystilben (4b)

7.4 NMR-Spektren

7.4.1 (*E*)-2-Hydroxystilben (1b)

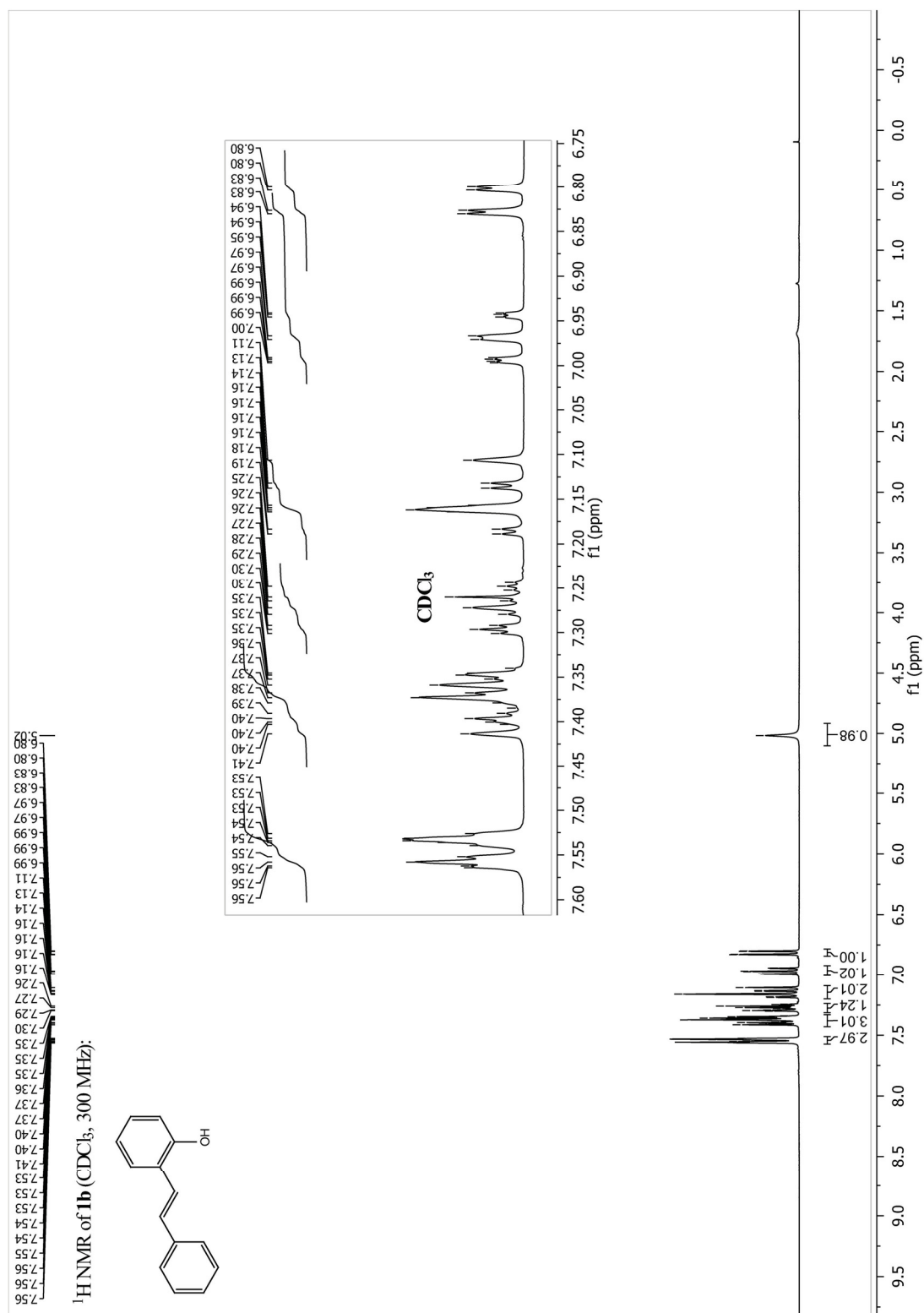
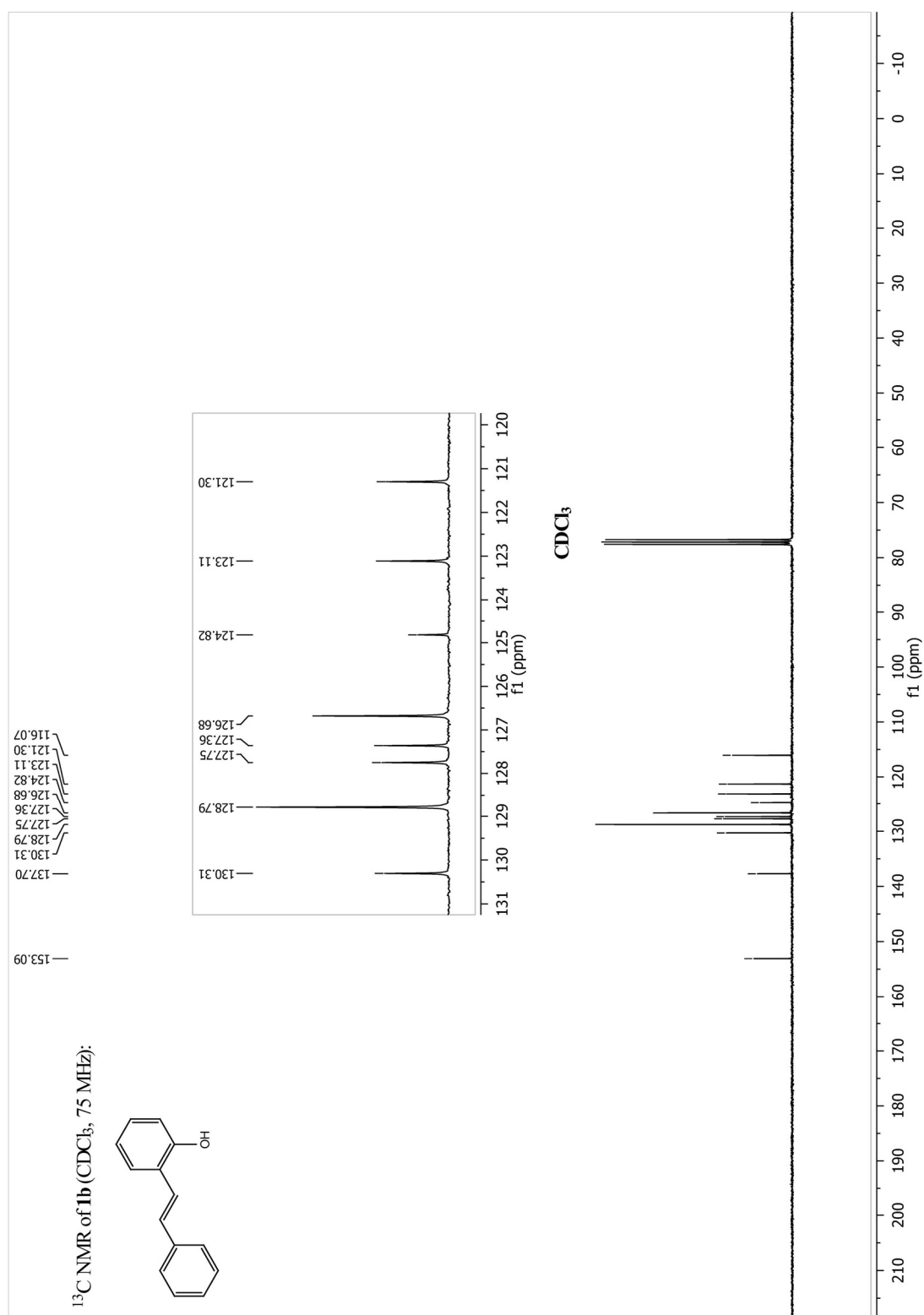
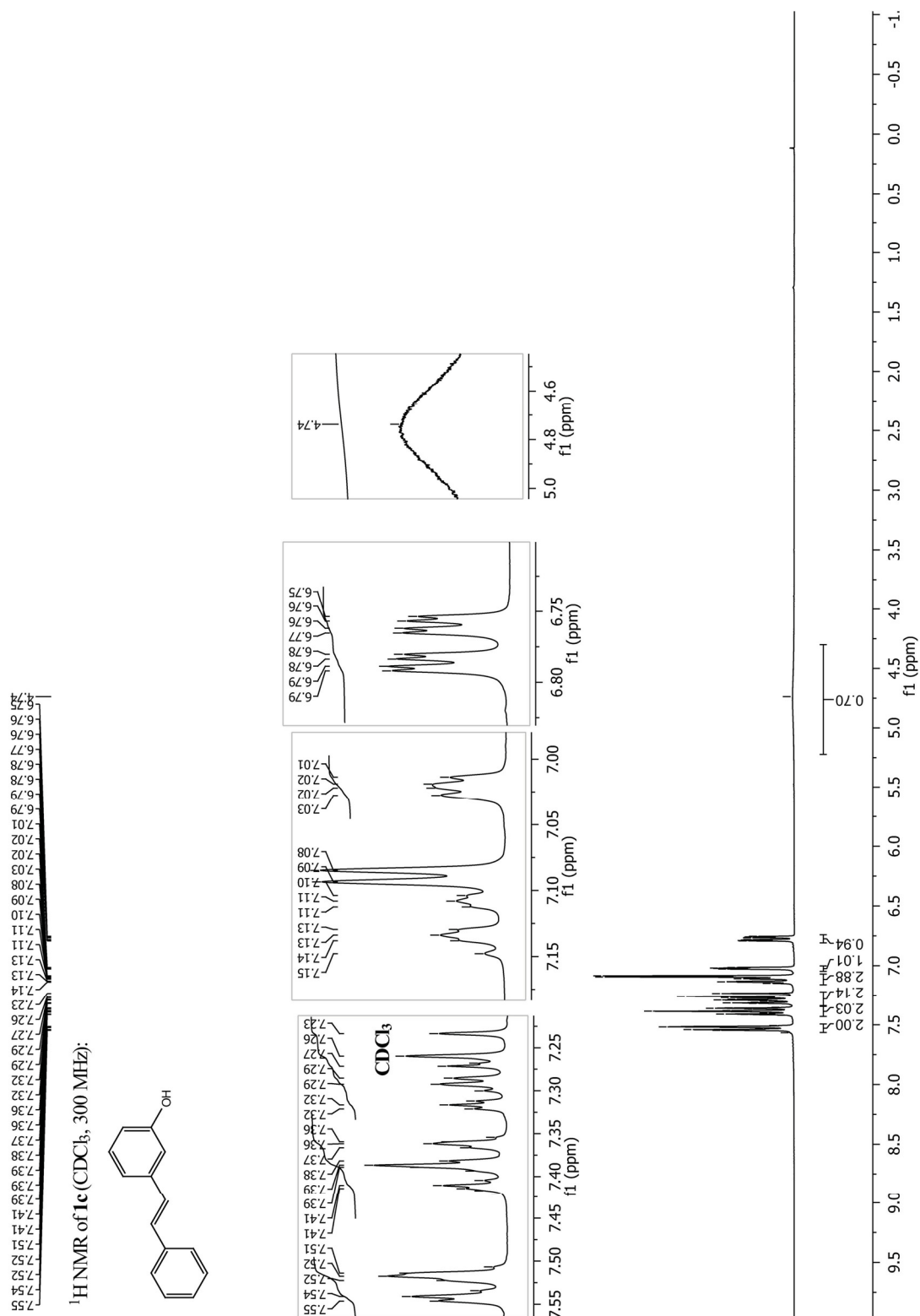
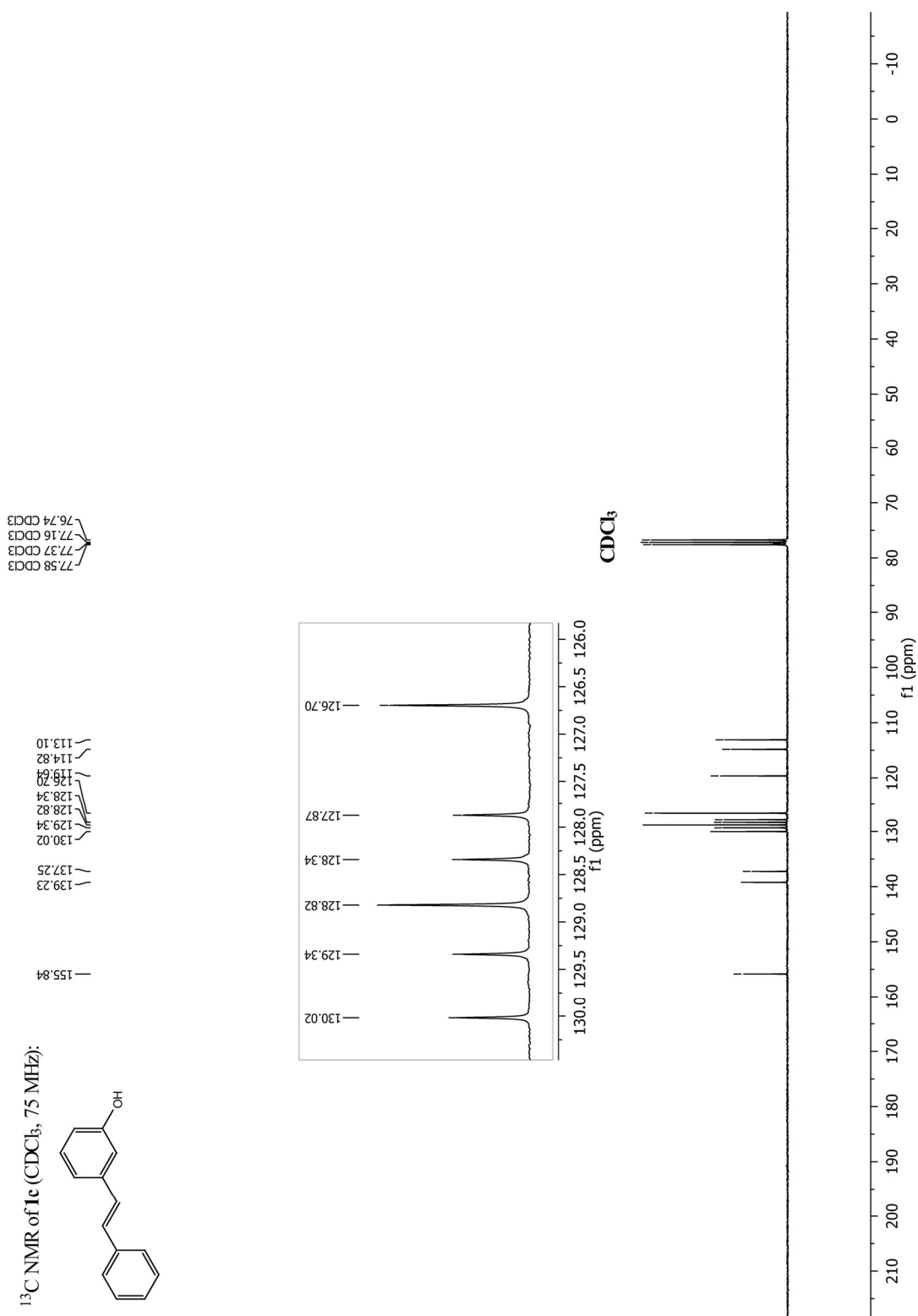
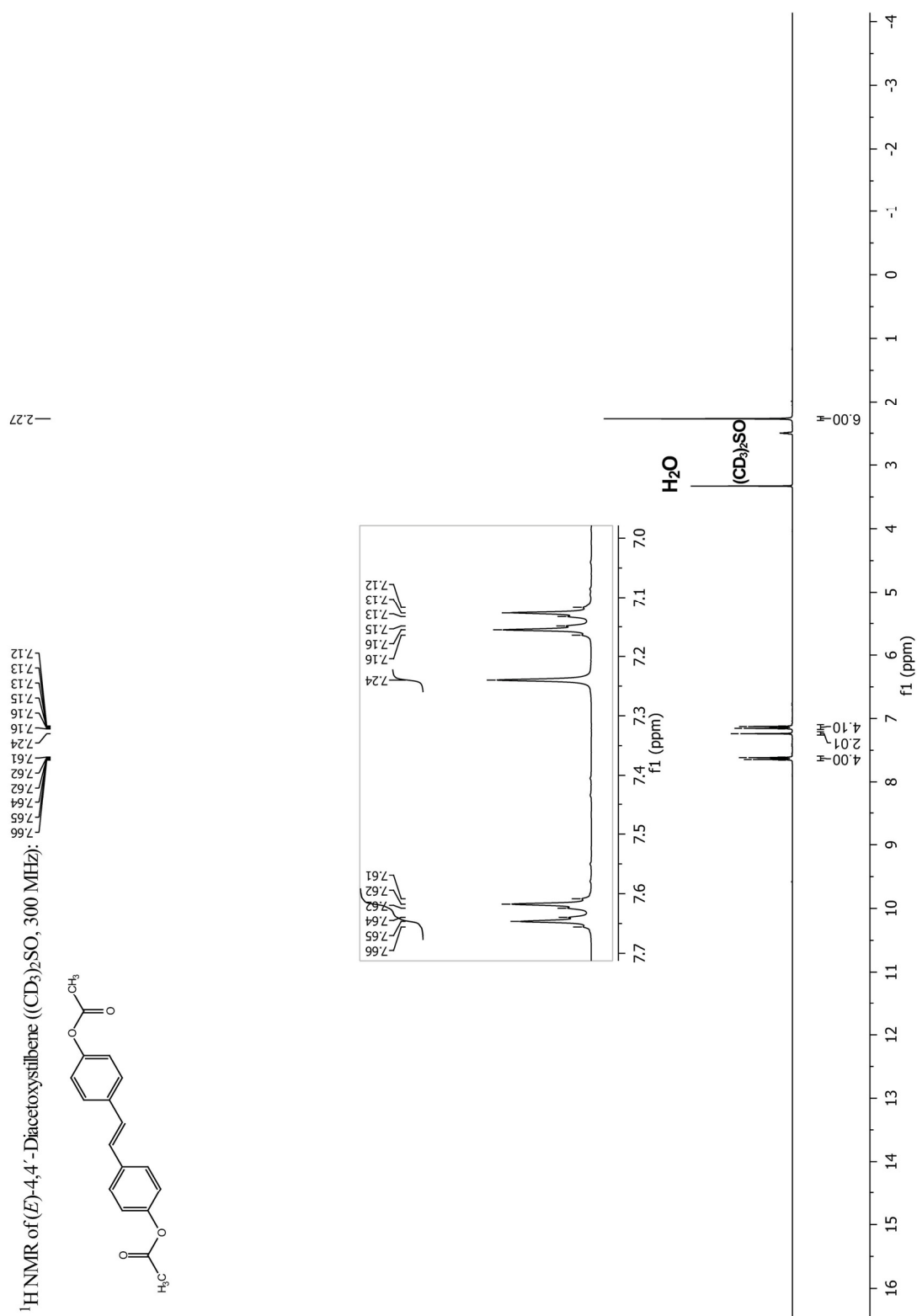


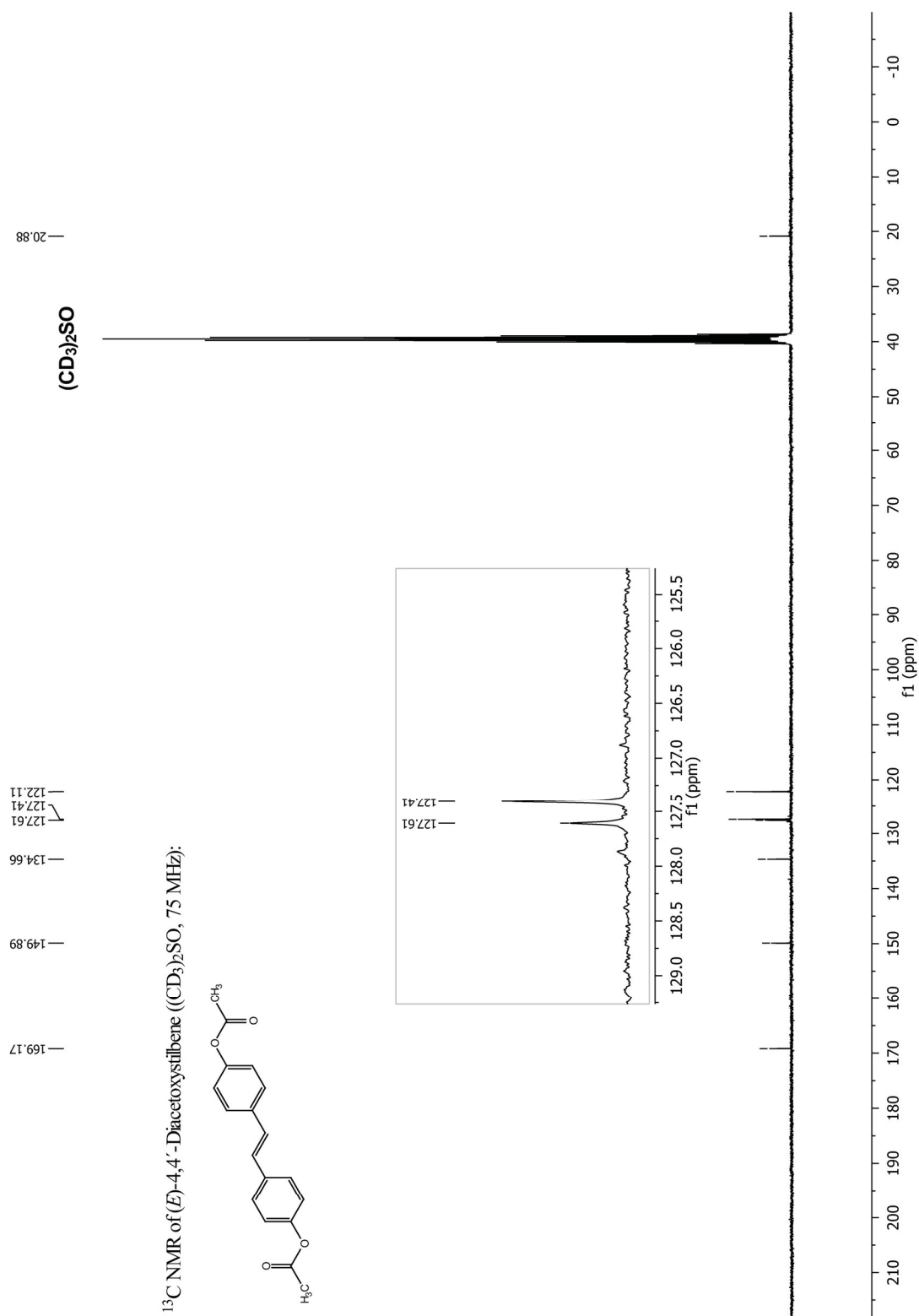
Abbildung 52. ¹H-NMR von (*E*)-2-Hydroxystilben (1b) in CDCl₃.

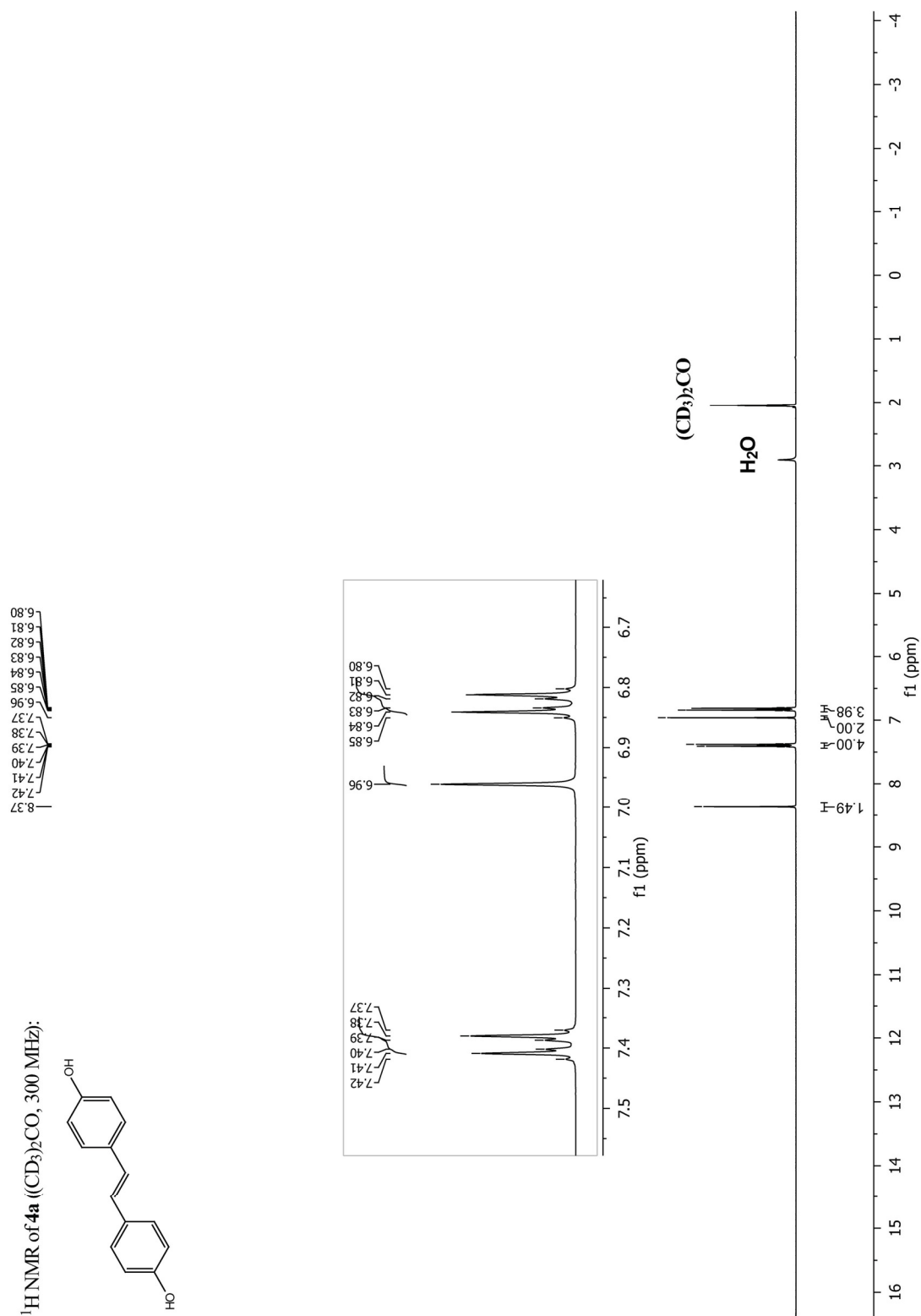
Abbildung 53. ¹³C-NMR von (E)-2-Hydroxystilben (1b) in CDCl₃.

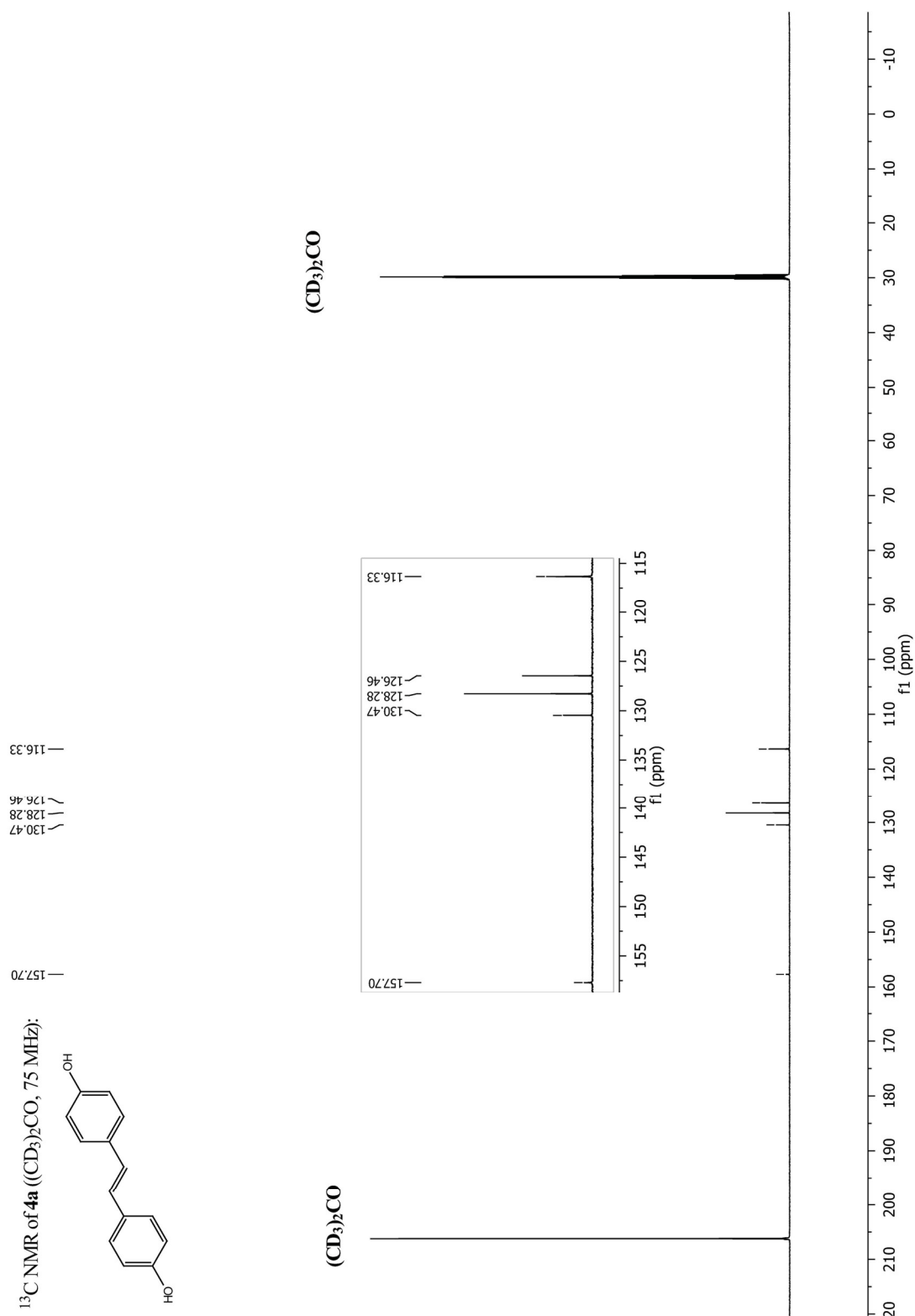
7.4.2 (*E*)-3-Hydroxystilben (1c)Abbildung 54. ¹H-NMR (*E*)-3-Hydroxystilben (1c) in CDCl₃.

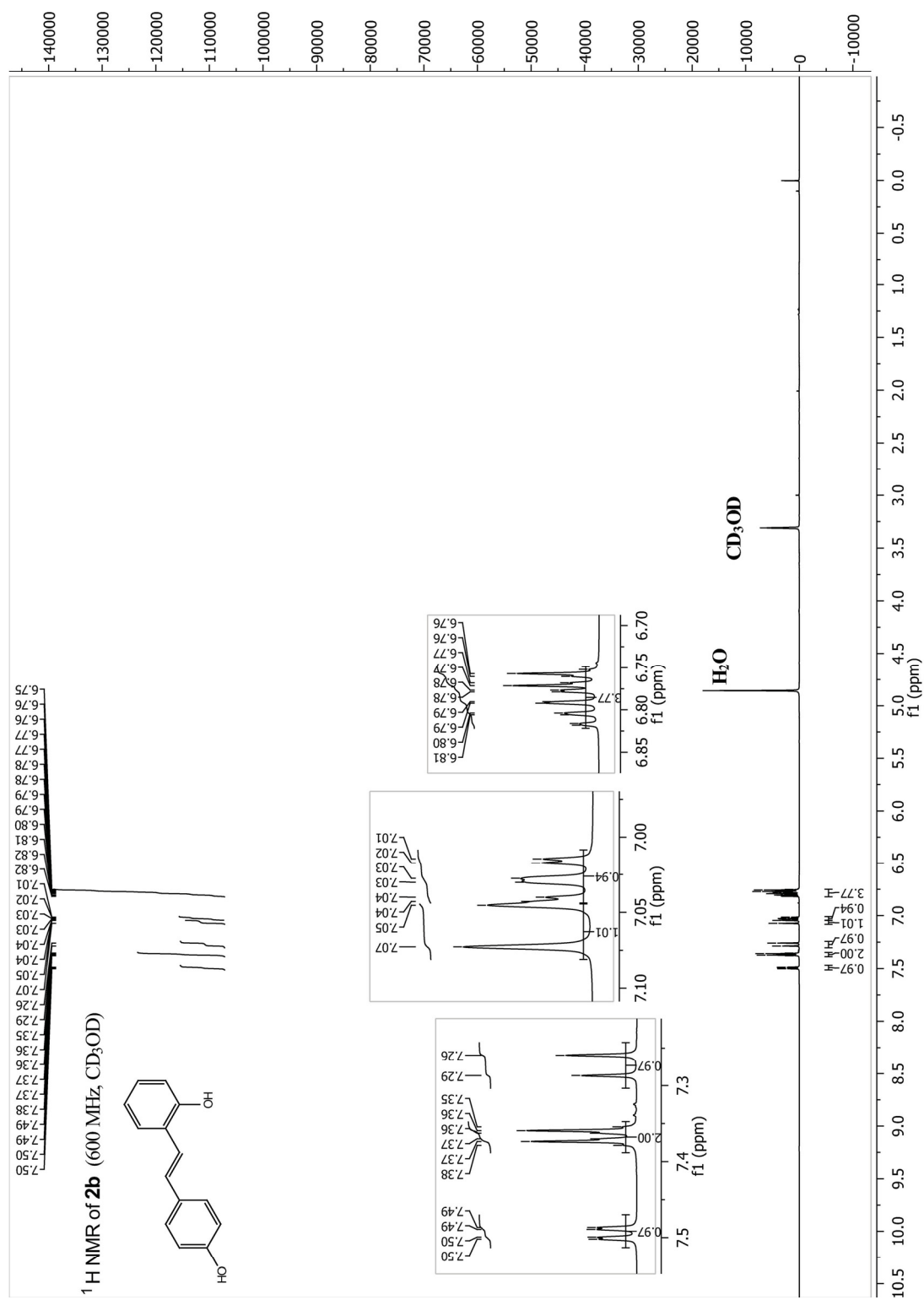
Abbildung 55. ¹³C-NMR von (*E*)-3-Hydroxystilben (**1c**) in CDCl₃.

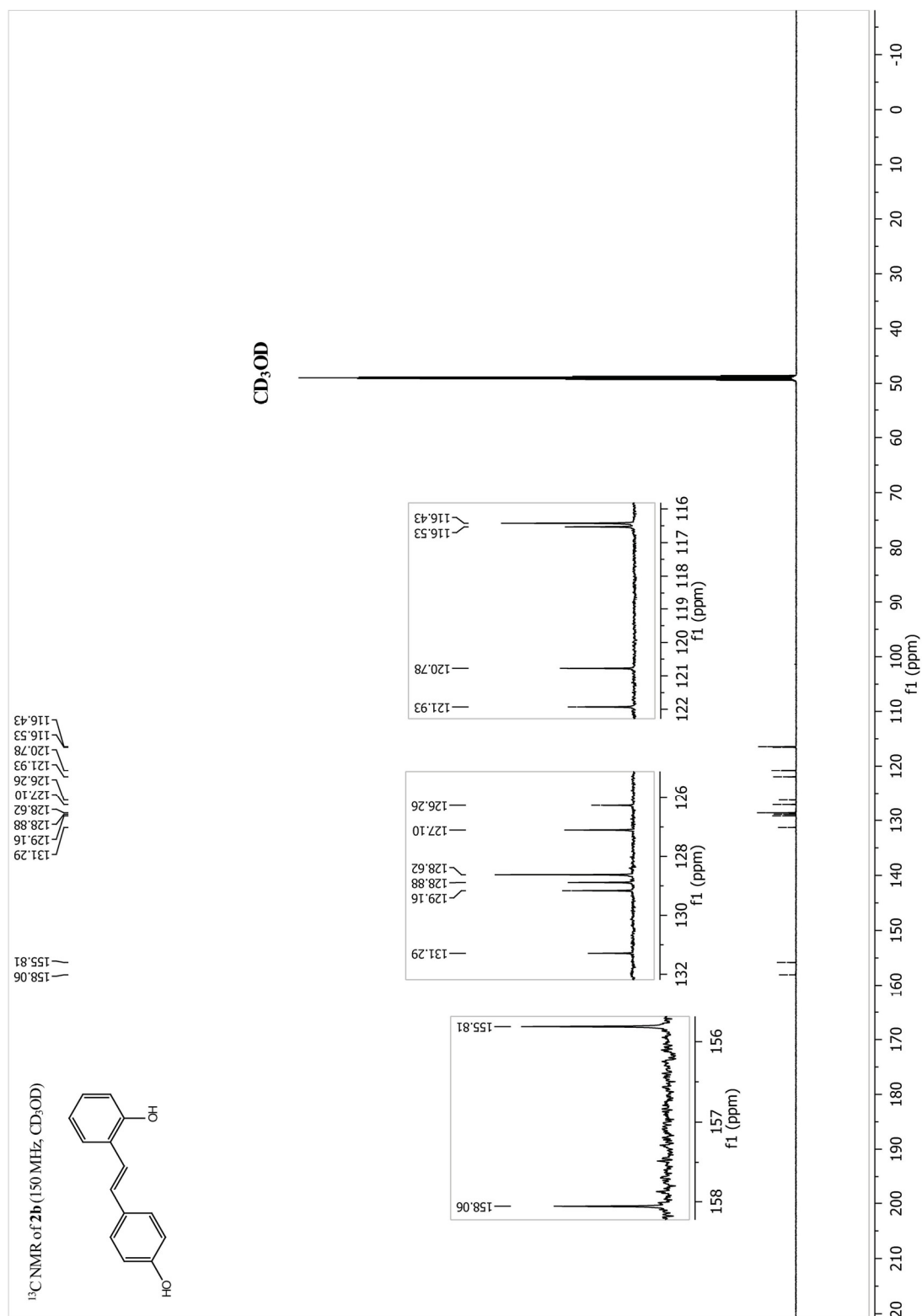
7.4.3 (*E*)-4,4'-DiacetoxystilbenAbbildung 56. ¹H-NMR von (*E*)-4,4'-Diacetoxystilben in (CD₃)₂SO

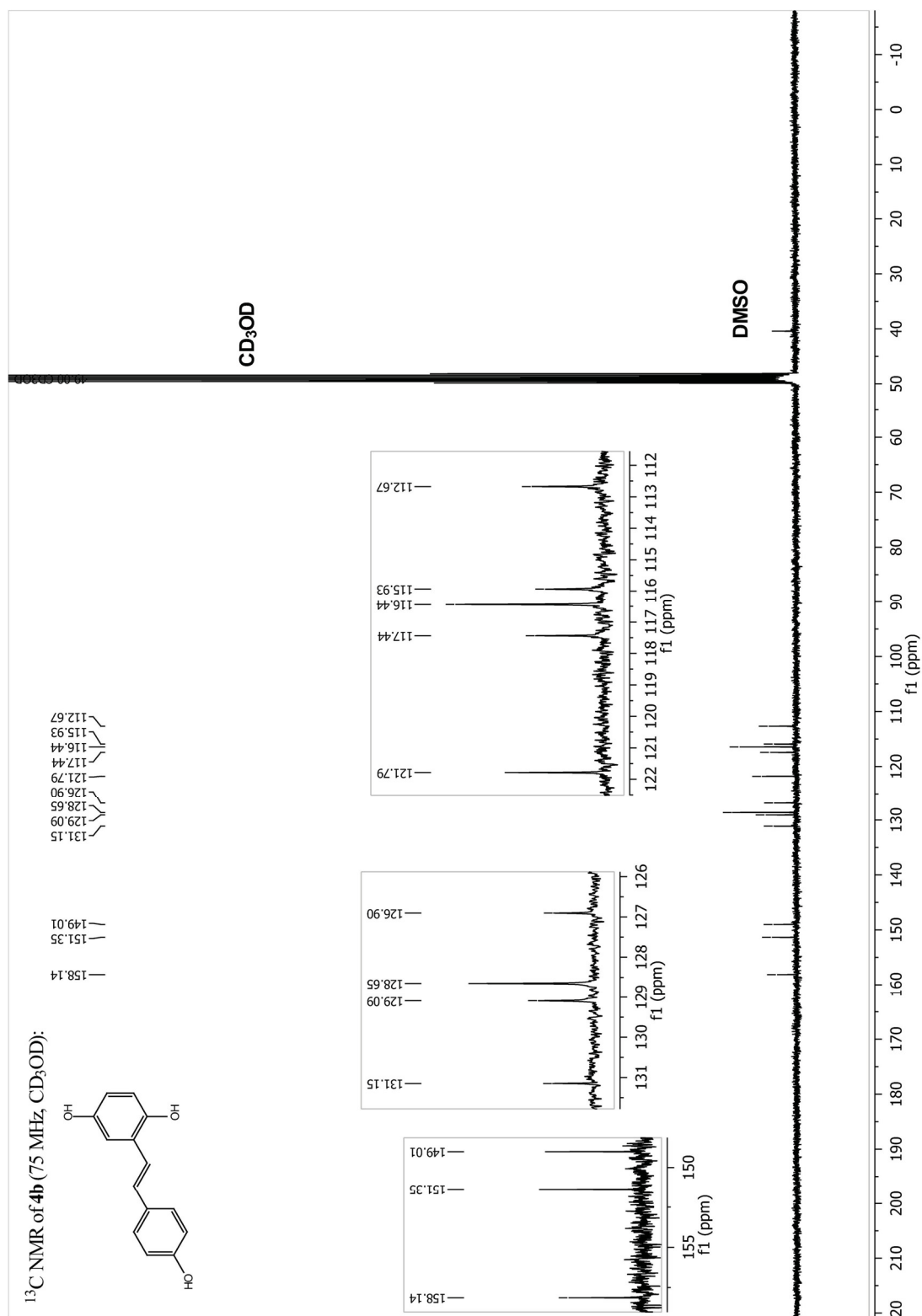
Abbildung 57. ^{13}C -NMR von (*E*)-4,4'-Diacetoxystilben in (CD_3) $_2\text{SO}$

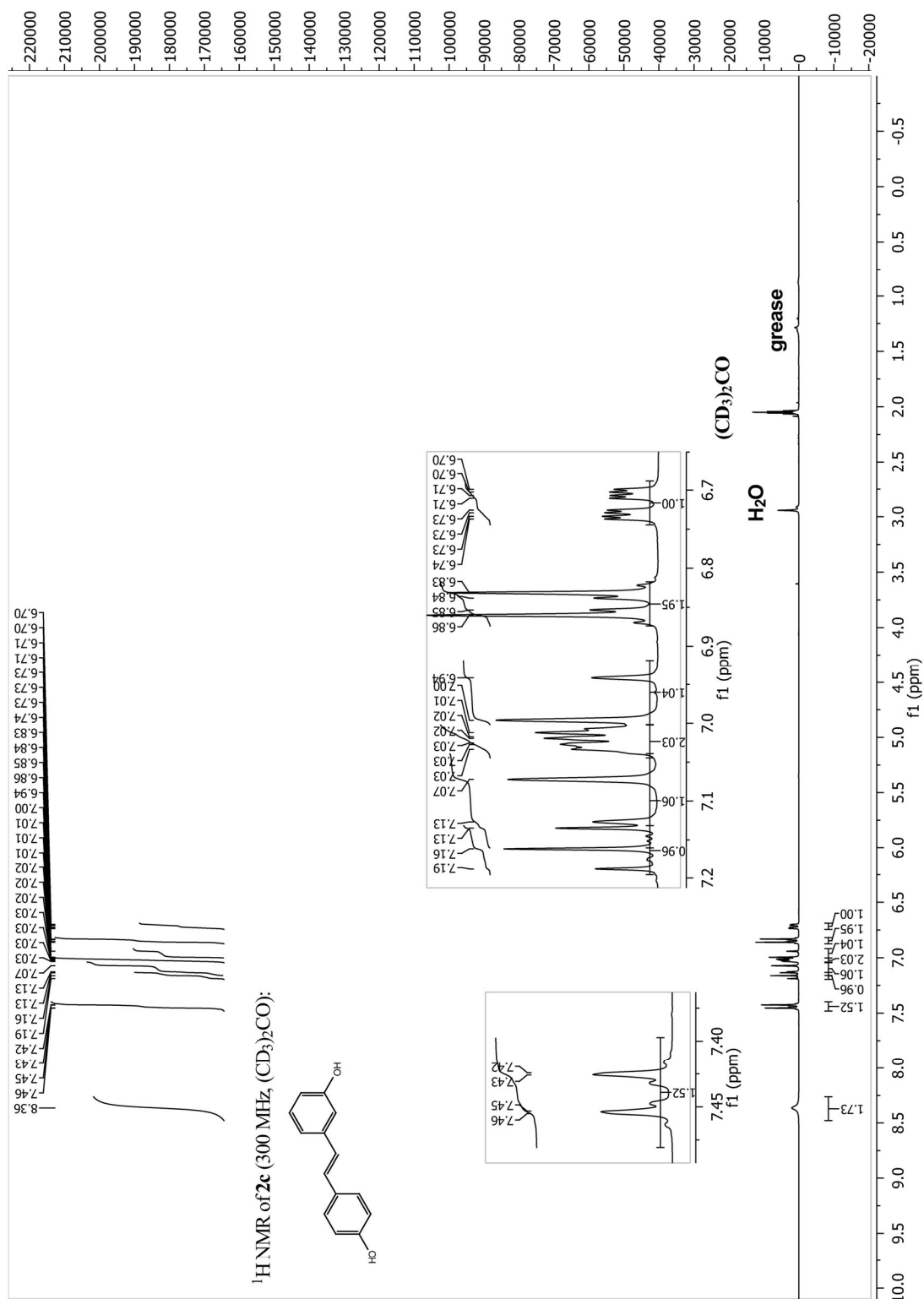
7.4.4 (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (4a)Abbildung 58. ¹H-NMR von (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) in (CD₃)₂CO

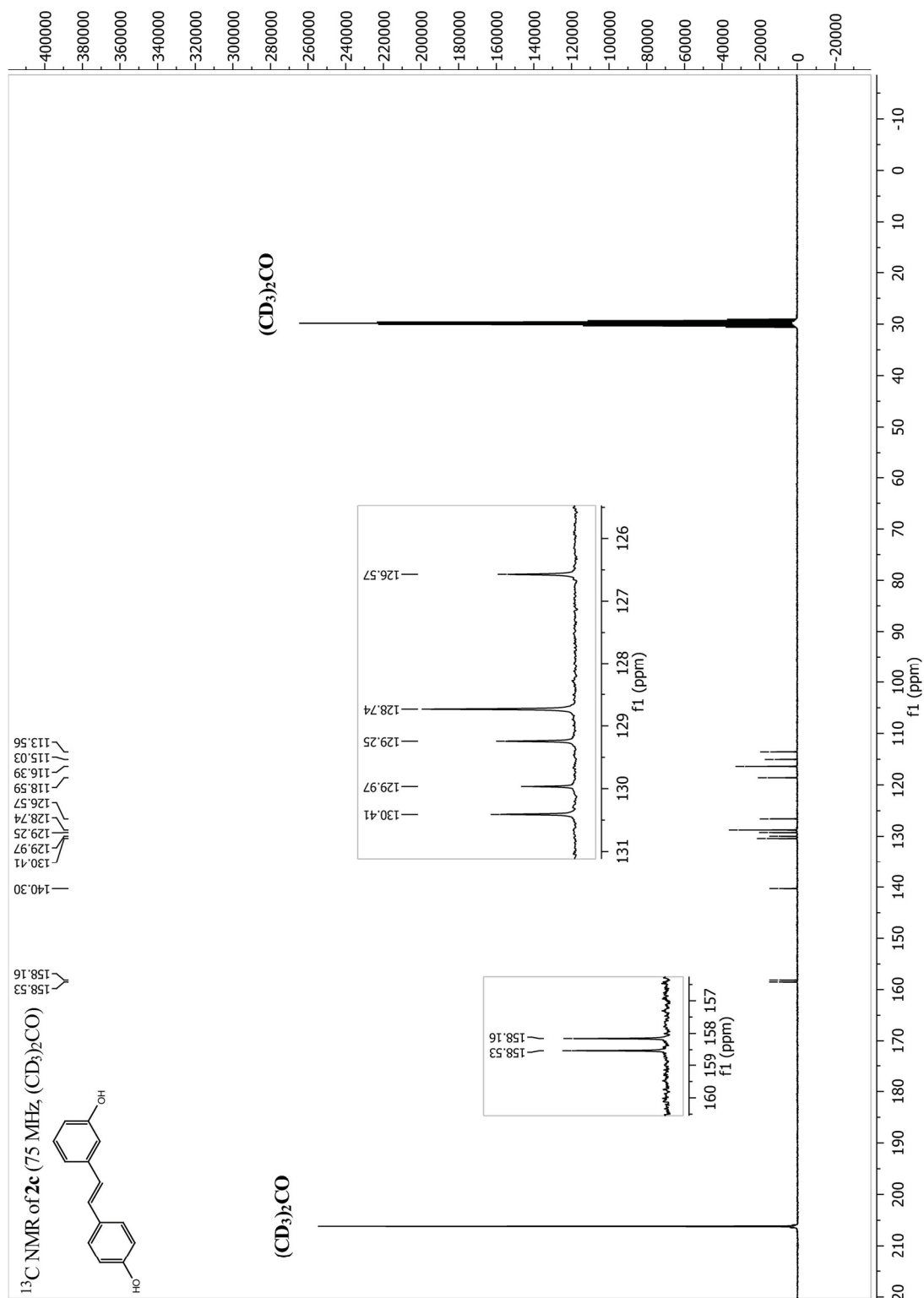
Abbildung 59. ^{13}C -NMR von (*E*)-4,4'-Dihydroxystilben (**4a**) in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

7.4.5 (*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (2b)Abbildung 60. ¹H-NMR von (*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (2b) in CD₃OD

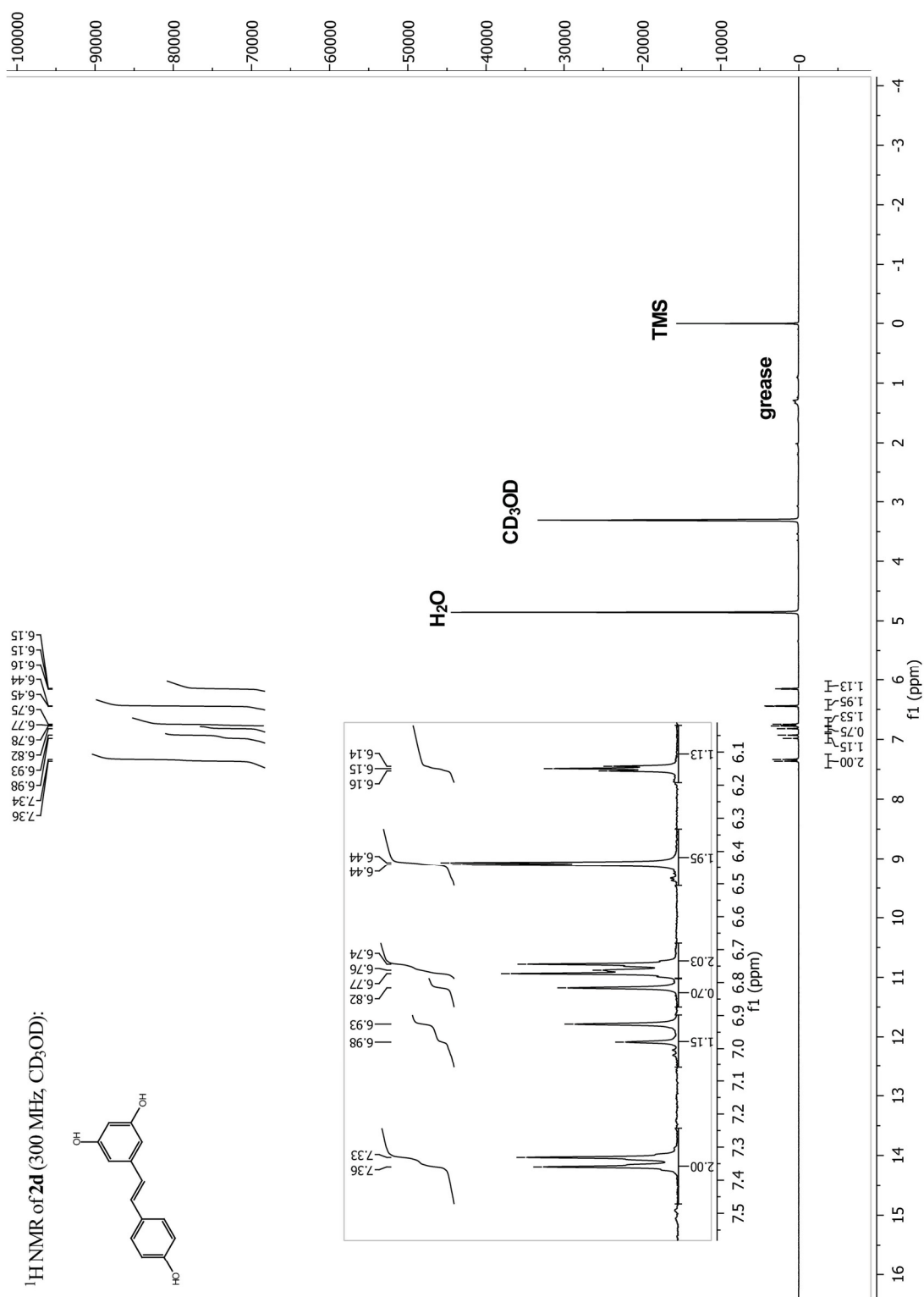
Abbildung 61. ¹³C-NMR von (*E*)-2,4'-Dihydroxystilben (**2b**) in CD₃OD

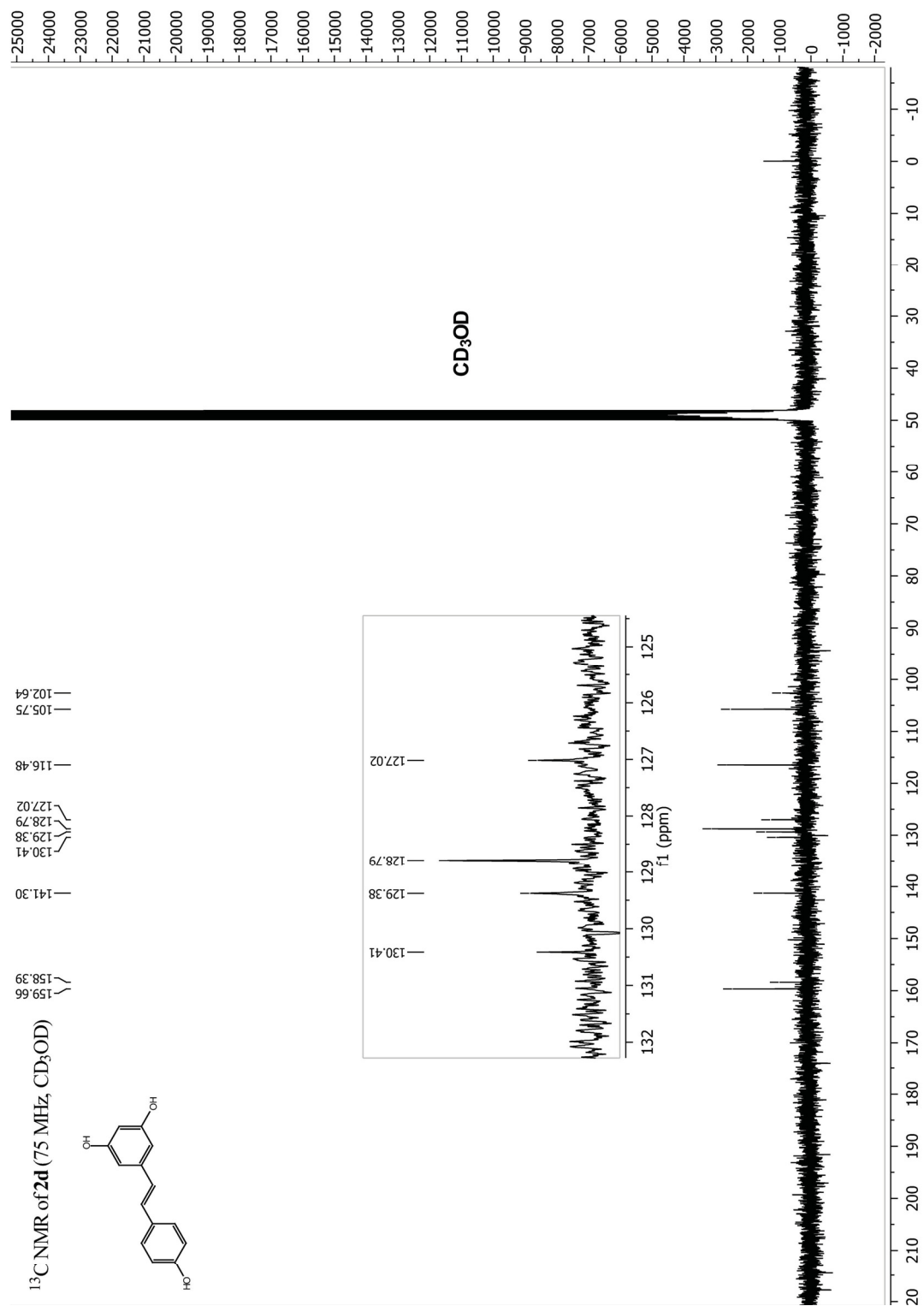
Abbildung 63. ¹³C-NMR von *(E)*-2,4',5-Trihydroxystilben (**4b**) in CD₃OD

7.4.7 (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (2c)Abbildung 64. ¹H-NMR von (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (2c) in (CD₃)₂CO

Abbildung 65. ¹³C-NMR von (*E*)-3,4'-Dihydroxystilben (**2c**) in (CD₃)₂CO

7.4.8 Resveratrol (2d)

Abbildung 66. ¹H-NMR von Resveratrol (2d) in CD₃OD

Abbildung 67. ¹³C-NMR von Resveratrol (2d) in CD₃OD

7.5 Proteinsequenzen und Proteinsequenzalignment

7.5.1 Proteinsequenzen der verschiedenen CYP154F1-Versionen

>CYP154F1_l.v.

```
MAVSADHAAAGALPGARHPAGRRVRAGRRLLDHRLRSGTRRPGGCPVHRPAQPVRDPRPPGVGDRA
PRVPGAADLPADRGRRGCEAAGPVAGRASRGSPRVAGAAPFPVRPRTQGASCHLHPRRHPTNGGT
MAAVPEPIVLVPGKSREQALQLREAGPLARVVVEGLEVWALTHDRELREALIDPRFRNRNWRWTRAL
NEGEVATDHPVAAMVYLDNMLTVDGEAHRMRSPVAQAFTPRRVELLRPRVTEIVNALLDQLAERD
GTVDFKTEFAYPLSMRVFSALFGIPERDHGRMQQMVNTAFSPSSPEEVRAMREELDAFLDELIEDK
RRSPGEDLTSALVTATDEEHKLSDAELRDTLWLLVTAGFETTSSALANAVQTLLTHPDQLAHLRSG
SIAWEDAIEEVLRQSSSVATLPFLFAAEDVQIGDRTIRAGEPVLLAYLAANLDVERYGEDAAEFDA
TQSRPRHLAFGHGPHTCLGAALARLEMEVALTTLFTEFPEVSLAEGEAPRLESVFIHAPAALPIRL
GPRRTAA
```

Abbildung 68. Proteinsequenz der längeren Version von CYP154F1. Diese Version stammt von einer früheren Annotierung (tfus_3014, NZ_AAAQ01000042a).

>CYP154F1_s.v.

```
MVVEGLEVWALTHDRELREALIDPRFRNRNWRWTRALNEGEVATDHPVAAMVYLDNMLTVDGEAHR
MRSPVAQAFTPRRVELLRPRVTEIVNALLDQLAERDGTVDKTEFAYPLSMRVFSALFGIPERDHG
RMQQMVNTAFSPSSPEEVRAMREELDAFLDELIEDKRRSPGEDLTSALVTATDEEHKLSDAELRDT
LWLLVTAGFETTSSALANAVQTLLTHPDQLAHLRSGSIAWEDAIEEVLRQSSSVATLPFLFAAEDV
QIGDRTIRAGEPVLLAYLAANLDVERYGEDAAEFDATQSRPRHLAFGHGPHTCLGAALARLEMEVA
LTTLFTEFPEVSLAEGEAPRLESVFIHAPAALPIRLGPRRTAA
```

Abbildung 69. Proteinsequenz der kürzesten Version von CYP154F1. Diese Version entspricht der aktuellen Annotierung (tfu_1748, AAZ55783.1).

>CYP154F1

```
MAAVPEPIVLVPGKSREQALQLREAGPLARVVVEGLEVWALTHDRELREALIDPRFRNRNWRWTRAL
NEGEVATDHPVAAMVYLDNMLTVDGEAHRMRSPVAQAFTPRRVELLRPRVTEIVNALLDQLAERD
GTVDFKTEFAYPLSMRVFSALFGIPERDHGRMQQMVNTAFSPSSPEEVRAMREELDAFLDELIEDK
RRSPGEDLTSALVTATDEEHKLSDAELRDTLWLLVTAGFETTSSALANAVQTLLTHPDQLAHLRSG
SIAWEDAIEEVLRQSSSVATLPFLFAAEDVQIGDRTIRAGEPVLLAYLAANLDVERYGEDAAEFDA
TQSRPRHLAFGHGPHTCLGAALARLEMEVALTTLFTEFPEVSLAEGEAPRLESVFIHAPAALPIRL
GPRRTAA
```

Abbildung 70. Proteinsequenz von CYP154F1. Diese Version ist 30 Aminosäuren N-terminal länger als CYP154F1_s.v. und wurde in dieser Arbeit für die Charakterisierung verwendet (siehe Kapitel 2.1.1).

CYP154A1_Sc

1 10 20 30 40 50

β1 T.T α1 β2 β3

CYP154A1_Sc M A T Q O P A L V L D P . T G A F H H T E H R T L R E G G P A T W V D V L G V Q A W S V S D P V
 CYP154A8_Nf M E S T Q M P L V L D P . I G A D I Q G E S E R L R A R G P V T S V E M P G G V R A W S V T D P A
 CYP154H1_tfu M M A S P T D N P I V L D P . Y V S D I E G E R E R L Y E A G P I A W V E L P G G V R T W S V T H H Q
 CYP154C5_Nf M N A C P H S D T L I D P . M I T D L A G E T S R L R A A G P L T R I D L L G V P A L A V T G H T
 CYP154C3_sgri M N . C P H T A A A Q T D P G A G T V V I D P . M V Q D L D G E T A R L R D A G V L A R I D L L G V P A W T V T R H A
 CYP154C1_Sc M T T G T E E A R I P L D P . F V T D L D G E S A R L R A A G P L A A V E L P G G V P V W A V T H H A
 CYP154E1_tfu M G Q S R R P H T V Y L D P A K G V D I P A Q R R E L L D K G P V V R V A F P G N L E V W A L T H D A
 CYP154F1_tfu M A A V P E P I V L V P G K S R E . . . Q A L Q L R E A G P L A R V V V E . . . L E V W A L T H D R
 CYP101A1_P450cam T T E T I O S N A N L A P L P P H V P E H L V F D F D M Y N P S N L S A G V Q . . . L E A W A V L Q E S
 CYP102A1_BM3 M T I K E M P Q P K T F G E L K N L P L L N . . T D K P I Q T L M K I A D E L G E I F K F E A P G R V T R Y L S S Q R

CYP154A1_Sc

50 60 70 80 90

α2 β4 α3 α4 α5 η1

CYP154A1_Sc L L K Q L L T S S D V S K D A R A H W P A F . . G E V V G T W P L A L W V A V E N . . M F T . . A
 CYP154A8_Nf L L K Q L L V D P R V S K D P R Q H W P A F I N G E I S Q D W P L F L W V A V T N . . M F T . . A
 CYP154H1_tfu A A R E L L T D S R L S K M . A H W G A Y N R G E I S P T W P L L S V I P P T P T N L L G . . T
 CYP154C5_Nf L A R Q L L T D T R L V K D I . N A W S L W Q S G T V T R Q W P L I G M I D V D R . S M F T . . V
 CYP154C3_sgri E A R Q L L T D Q R L V K D I . D A W G L W Q S G V V T R A W P L I G M I D A G R . S M F T . . V
 CYP154C1_Sc E A K A L L T D P R L V K D I . N V W G A W R R G E I P A D W P L I G L A N P G R . S M L T . . V
 CYP154E1_tfu P L R N A L A D E S V F V R G W R N W R A L M A G E V D P T H P V A N M L R V E S . . M L A . . R
 CYP154F1_tfu E L R E A L I D P R F R R N W . R T W R A L N E G E V A T D H P V A M V Y L D N . . M L T . . V
 CYP101A1_P450cam N V P D L V W T R C N G G H W I A T R G Q L I R E A Y E D Y R H F S S E C P F I P R E A G E A Y D F I P T S M
 CYP102A1_BM3 L I K E A C D E S R F D K N L S Q A L K E V R D F A G D G . . L F T S W T

CYP154A1_Sc

100 110 120 130 140

α6 η2 α7 β5 α8

CYP154A1_Sc Y G P N H R K L R L V A P A F S A R R V D A M R E A V E A M V T G L V D R L . A E L P A G E P V D L R Q E
 CYP154A8_Nf Y G A D H R R L R K L V A P A F T P R R V E A M R G Q V E R I I T K E L L D T L . A Q T P A G E A V D L R E A
 CYP154H1_tfu D G A E H K R L R L T A Q A F T P R R V E A L R P R I R E I T E E L L D A L . E E R A . N E P Q D L K S E
 CYP154C5_Nf D G P E H R R L R I K T T Q A L T P R R L D A L K F T I E R Y V A E L L D D L E R A G A D G A V V D L K S V
 CYP154C3_sgri D G A E H R R L R T K T S Q A L T P R R L E A I R E P I E K F T D E L L D A L D A A R G E D G V V D L K S V
 CYP154C1_Sc D G A E H R R L R T L V A Q A L T V R R V E A M R G R I T E L T D R L L D E L . P A D . . G G V V D L K A A
 CYP154E1_tfu S G A D H K R M R G L V Q A A F T P R R V E A L R P R I R E I T E E L L D R M . A E S . . D G V V D L K A A
 CYP154F1_tfu D G E A H R R M R S P V A Q A F T P R R V E A L R P R I R E I T E E L L D Q L . A E R . . D G T V F K T E
 CYP101A1_P450cam D P P E Q R Q F R A L A N Q V G M P V V D K L E N R I Q E L A C S L I E S L . R P . . . Q G Q C N F T E D
 CYP102A1_BM3 H E K N W K K A H N I L L P S F S Q A M K G Y H A M V D I A V Q L I Q K W . E R L N A D E H I E V E D M T R L T L

CYP154A1_Sc

150 160 170 180

α9 α10

CYP154A1_Sc L A Y P L P I A V I G H L M G V P Q D R R D G F R A L V D G V F D T T L Q A E A Q A N T A
 CYP154A8_Nf F A Y P L P I Q V I S E L M G V P E D L N P G L R A C V D G I F D T S L T A E Q A A N Y G
 CYP154H1_tfu F S F K L P M R V I G E L Y G V E E A A H G Q L R S L Y D K F F S S V T P E E F L A T R E
 CYP154C5_Nf F A Y P L P M R V I S A L M G V P S E D Q E Q L L T W Y K A F F S I L T P Q D E R L R V I D
 CYP154C3_sgri F A Q P L P M K V V G M L M G V D E S Q H A M L T R Q Y K A F F S M L T P Q E E R V A L L A
 CYP154C1_Sc F A Y P L P M Y V V A D L M G I E E A R L P R L K V L F E K F F S T Q T P E E V V A T L T
 CYP154E1_tfu Y S F P L P I R V I S E L L G I N E E D H L T L Q T L V T R T L S G T D P E A N A D . . .
 CYP154F1_tfu F A Y P L S M R V S A L F G I P E R D H G R M Q M V N T A F S P S S P . E E V R A M R E
 CYP101A1_P450cam Y A E P F P I R I F M L L A G L P E E D I P H L K Y L T D Q M T R P D G S M T F A E A . K E
 CYP102A1_BM3 D T I G L C G F N Y R F N S F Y R D Q P H P F I T S M V R A L D E A M N K L Q R A N P D D P A Y D E N K R Q F Q E D I K

CYP154A1_Sc

190 200 210 220 230 240

α11 α12 α13

CYP154A1_Sc R Y E V L D Q L T A A K R A T . . P G D D M T S L L T A R D D E G D G D R L S P E L R D T L L M T S A G Y E T T
 CYP154A8_Nf E M Y R I L G E L I A Y R R A N . . P G E D M T S L L I T Q R D D . E G S S L T D Q E L L D T L L V I S A G H E T T
 CYP154H1_tfu A L V Q F Y T E L M E R K K A N . . P S D D L T T A L L Q A N E . . N G D R M T D E E V L G T L Q I V V A A G H E T T
 CYP154C5_Nf E M H C Y F T E M V R R K T A E . . P G D D L T S A L I Y A T D . . G E T P L T E E E V I G N L Q A L V A A G H E T T
 CYP154C3_sgri E L D V F Y T D L V R E K T A R . . P T D D L T S A L I L A E E . . G E P L T E E E V G N L K A M V A A G H E T T
 CYP154C1_Sc E L A S I M T D T V A A K R A A . . P G D D L T S A L I Q A S E . . N G D H L T D A E I V S T L Q L M V A A G H E T T
 CYP154E1_tfu . . F T F V A S L I E A K R K N . . L D D G L I S A M V A R A E . . D G R L S E T E L I H N T L L L I G F E T T
 CYP154F1_tfu E L D A F L D E L I E Q K R R S . . P G E D L T S A L V T A T D . . E E H K L S D A E L R D M T L L V T A G G L D T V
 CYP101A1_P450cam A L Y D Y L I P I E Q R R Q K . . P G T D A I S I V A N G O V . . N G R P I T S D E A E K R M C G L L L V G L D T V
 CYP102A1_BM3 V M N D L V D K I I A D R K A S G E Q S D D L L T H M L N G K D P E . T G E P L D D E N I R Y Q I I T F L I A G H E T T

CYP154A1_Sc

250 260 270 280 290

α14 α15 α16

CYP154A1_Sc V N V I D Q A V H T L L T R P D Q L A L V R K G E V T W A D V V E E T L R H E P A V K
 CYP154A8_Nf V N L L D Q A V F A L L T H P E Q R A A L A E G R A T W T D V V E E S L R F E A P I A
 CYP154H1_tfu V N L L T N T V R A L L R F P D Q L E L L R T G K A T W E A A I E E S L R W D P P T T
 CYP154C5_Nf V S L I L T A V R A L L S H P E Q L R M V R D G E I G W E T A I E E T L R W D G P V I
 CYP154C3_sgri I G L V L N A V R A L L S H P D Q L R M V L A G E A G W D A I E E T L R W D T P T T
 CYP154C1_Sc I S L I V N A V V N L S T H P E Q R A L V L S G E A E W S A V V E E T L R F S T P T S
 CYP154E1_tfu M G M I S N S V Q L L T H P D Q L H L L R T G A S W E N A I E E C L R F E S A V V
 CYP154F1_tfu S S A L A N A V Q T L L T H P D Q L A H L R S G S I A W E D A I E E V L R Q S S S V A
 CYP101A1_P450cam V N F L S F S M E F L A K S P E H R Q E L I E R P E R I P A C E E L R R F S S L V A
 CYP102A1_BM3 S G L L S F A L Y F L V K N P H V L Q K A E E A A R V L V D P V P S Y K Q V K Q L K Y V G M V L N E A L R L W . P T A

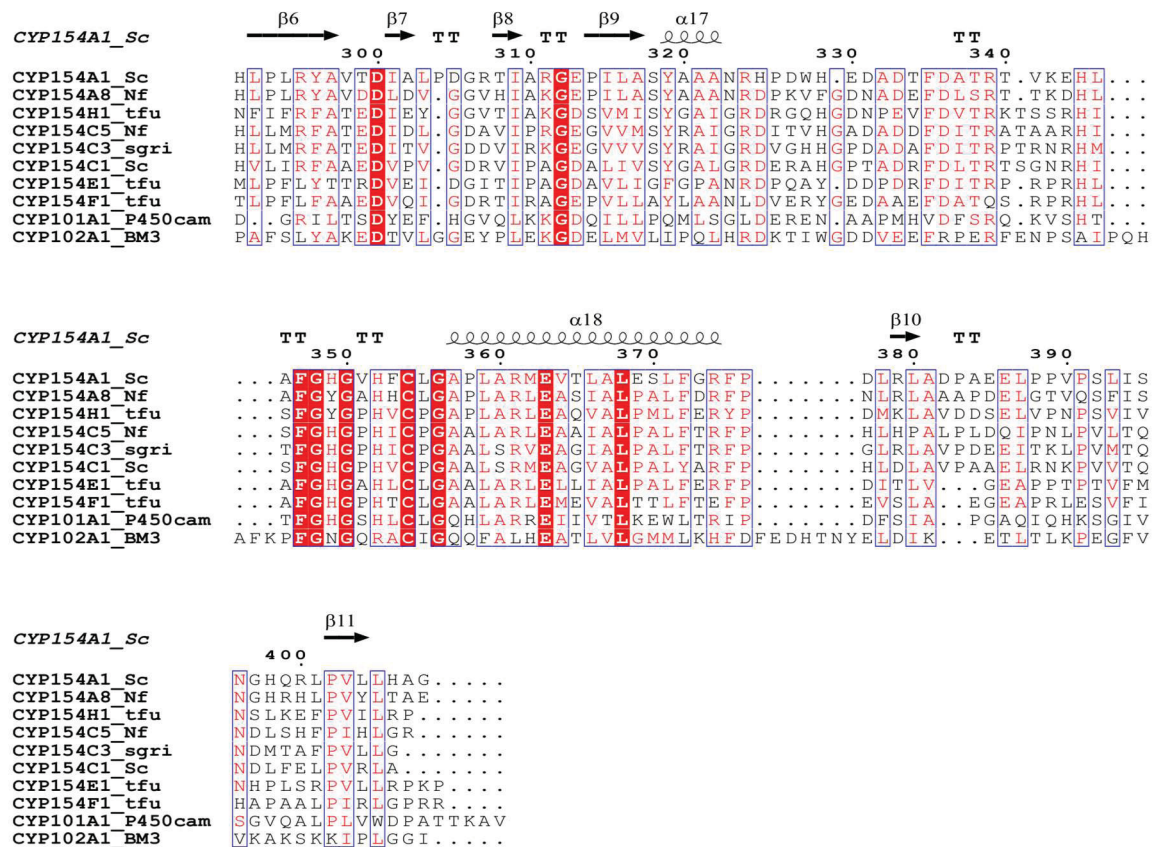


Abbildung 71. Proteinsequenzalignment von charakterisierten P450-Enzymen aus der Familie 154 mit CYP154F1. CYP154A1^[67,74] und CYP154C1^[74,75] aus *S. coelicolor* A3(2), CYP154A8^[76–78] und CYP154C5^[76]^[36,76,79] aus *N. farcinica* IFM 10152, CYP154E1^[73,80,81] und CYP154H1^[82] aus *T. fusca* YX, und CYP154C3^[83] aus *S. griseus*. Zum Vergleich wurden zusätzlich die intensiv erforschten CYP102A1 aus *B. megaterium* (P450-BM3) und CYP101A1 aus *P. putida* (P450cam) in das Alignment mit einbezogen. Die Angaben der sekundären Strukturelemente basieren auf CYP154A1 (1ODO). α: α-Helix, β: β-Faltblatt, T: turn. Die konservierten Bereiche sind mit einem roten Hintergrund hinterlegt. Ähnliche Aminosäuren sind mit roten Buchstaben dargestellt. Das Proteinsequenzalignment wurde mit MAFFT und ESPrpt 3.0 erstellt.